

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA EN VIRTUD DEL TRATADO DE COOPERACIÓN
EN MATERIA DE PATENTES (PCT)

(19) Organización Mundial de la Propiedad
Intelectual
Oficina internacional



(43) Fecha de publicación internacional
14 de Octubre de 2004 (14.10.2004)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2004/087900 A1

(51) Clasificación Internacional de Patentes⁷: C12N 7/04,
15/866, A61K 39/12

(21) Número de la solicitud internacional:
PCT/ES2004/000147

(22) Fecha de presentación internacional:
31 de Marzo de 2004 (31.03.2004)

(25) Idioma de presentación: español

(26) Idioma de publicación: español

(30) Datos relativos a la prioridad:
P 2003 00751 31 de Marzo de 2003 (31.03.2003) ES

(71) Solicitantes (para todos los Estados designados salvo
US): CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES
CIENTÍFICAS [ES/ES]; Serrano, 117, E-28006 Madrid
(ES). BIONOSTRA, S.L. [ES/ES]; Ronda de Poniente, 4,
E-28760 Tres Cantos (ES).

(72) Inventores; e

(75) Inventores/Solicitantes (para US solamente): RO-
DRIGUEZ AGUIRRE, José, Francisco [ES/ES];
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano,
117, E-28006 Madrid (ES). GONZALES DE LLANO,
Dolores [ES/ES]; Consejo Superior de Investigaciones
Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). OÑA
BLANCO, Ana, María [ES/ES]; Consejo Superior
de Investigaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006
Madrid (ES). ABAITUA ELUSTONDO, Fernando
[ES/ES]; Consejo Superior de Investigaciones Científi-
cas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES). MARAVER
MOLINA, Antonio [ES/ES]; Consejo Superior de Investi-
gaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid (ES).
CLEMENTE CERVERA, Roberto [ES/ES]; Consejo
Superior de Investigaciones Científicas, Serrano, 117,

E-28006 Madrid (ES). RUIZ CASTÓN, José [ES/ES];
Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Serrano,
117, E-28006 Madrid (ES). RODRIGUEZ FERNAN-
DEZ-ALBA, Juan, Ramón [ES/ES]; Consejo Superior de
Investigaciones Científicas, Serrano, 117, E-28006 Madrid
(ES).

(74) Mandatario: ARIAS SANZ, Juan; ABG Patentes, S.L.,
Orense, 16, E-28020 Madrid (ES).

(81) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección nacional admisible): AE,
AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY,
BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ,
EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID,
IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI,
NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG,
SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ,
VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Estados designados (a menos que se indique otra cosa,
para toda clase de protección regional admisible): ARIPO
(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG,
ZM, ZW), euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU,
TJ, TM), europea (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE,
ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO,
SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN,
GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicada:

- con informe de búsqueda internacional
- antes de la expiración del plazo para modificar las reivin-
dicaciones y para ser republicada si se reciben modifica-
ciones

Para códigos de dos letras y otras abreviaturas, véase la sección
"Guidance Notes on Codes and Abbreviations" que aparece al
principio de cada número regular de la Gaceta del PCT.

(54) Title: COMPLETE EMPTY VIRAL PARTICLES OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV), PRODUCTION
METHOD THEREOF AND APPLICATIONS OF SAME

(54) Título: PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS COMPLETAS DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA
(IBDV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

(57) Abstract: The invention relates to complete empty viral particles of infectious bursal disease virus (IBDV), which contain all
of the antigenically-relevant proteinaceous constituents present in determinant IBDV virions and which can be obtained by means
of genetic engineering in suitable expression systems. The aforementioned capsids can be used in the production of vaccines against
avian disease, which is known as infectious bursitis and which is caused by IBDV, and in the development of gene therapy vectors.

(57) Resumen: Las partículas virales vacías completas del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) contienen todos los com-
ponentes proteicos antigénicamente relevantes presentes en los viriones de IBDV determinantes y pueden ser obtenidas en mediante
ingeniería genética en sistemas de expresión apropiados. Dichas cápsidas son útiles en la producción de vacunas frente a la enferme-
dad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para terapia génica.

WO 2004/087900 A1

Best Available Copy

WO2004087900

Publication Title:

COMPLETE EMPTY VIRAL PARTICLES OF INFECTIOUS BURSAL DISEASE VIRUS (IBDV), PRODUCTION METHOD THEREOF AND APPLICATIONS OF SAME

Abstract:

Abstract of WO2004087900

The invention relates to complete empty viral particles of infectious bursal disease virus (IBDV), which contain all of the antigenically-relevant proteinaceous constituents present in determinant IBDV virions and which can be obtained by means of genetic engineering in suitable expression systems. The aforementioned capsids can be used in the production of vaccines against avian disease, which is known as infectious bursitis and which is caused by IBDV, and in the development of gene therapy vectors. Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide d59

Courtesy of <http://v3.espacenet.com>

PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS COMPLETAS DEL VIRUS INDUCTOR DE LA BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y APLICACIONES

5 CAMPO DE LA INVENCION

La invención se relaciona con partículas virales vacías completas del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV), con actividad inmunogénica frente a IBDV, su producción mediante ingeniería genética y sus aplicaciones, en particular, en la producción de vacunas para sanidad animal, por ejemplo, en la elaboración de vacunas frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa causada por IBDV y en la elaboración de vectores para
10 terapia génica.

ANTECEDENTES DE LA INVENCION

Durante las últimas cuatro décadas del siglo XX se produjo la aparición y dispersión global de una enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa (IBD). La IBD se caracteriza
15 por la destrucción de las poblaciones de linfocitos pre-B que residen en la bolsa de Fabricio de los animales infectados (Sharma JM et al. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. Dev Comp Immunol. 24:223-35). Esta enfermedad está causada por el virus de la bursitis infecciosa (IBDV) perteneciente a la familia *Birnaviridae* (Leong JC et al. 2000. Virus Taxonomy Seventh Report of International
20 Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, San Diego, CA). A pesar de la implementación de programas de vacunación intensivos, basados en el uso de combinaciones de vacunas vivas e inactivadas, se siguen reportando brotes de IBD en todos los países productores de carne de pollo (van den Berg TP et al. 2000. Infectious bursal disease (Gumboro disease). Rev Sci Tech. 19:509-43).
25

Los viriones del virus de la bursitis infecciosa carecen de envuelta lipídica, presentan una estructura icosaédrica (simetría T=13) y tienen un diámetro de 65-70 nm (Bottcher B. et al. 1997. Three-dimensional structure of infectious bursal disease virus determined by electron cryomicroscopy. J Virol. 71:325-30; Castón JR et al. 2001. C terminus of infectious
30 bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the t number for capsid assembly. J Virol. 75:10815-28). La cápsida está formada por una única capa proteica que contiene cuatro polipéptidos diferentes denominados VPX, VP2, VP3 y VP1, respectivamente. Las proteínas VPX, VP2 y VP3 se producen mediante procesamiento

proteolítico de un precursor, denominado poliproteína viral, codificado por el segmento genómico A. La proteína VP1 se produce mediante expresión del gen correspondiente codificado por el segmento B.

La poliproteína viral, sintetizada como un precursor de 109 kDa, es procesada de forma cotraduccional dando lugar a la formación de tres polipéptidos denominados VPX, VP3 y VP4. VP4 es responsable de este procesamiento (Birghan C. et al. 2000. A non-canonical lon proteinase lacking the ATPase domain employs the Ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *Embo J.* 19:114-23). VP3 es un polipéptido de 29 kDa que forma subunidades triméricas que tapizan la capa interna de la cápsida. VPX (también conocida como pVP2) sufre un segundo procesamiento proteolítico que da lugar a la forma madura de la proteína denominada VP2. La superficie externa de los viriones está formada por subunidades triméricas constituidas por una relación variable de VPX y VP2 (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol.* 76:2384-92; Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73:6973-83). Se ha sugerido que la conversión de VPX a VP2 está asociada con la formación de cápsidas maduras (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J Virol.* 76:2384-92; Martínez-Torrecuadrada JL. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology.* 278:322-31). Los sitios de procesamiento proteolítico de la poliproteína han sido caracterizados (Da Costa B et al. 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol.* 76:2393-402; Sánchez AB & Rodríguez JF. 1999. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology.* 262:190-9), lo que permite una expresión fidedigna de los polipéptidos de la cápsida. La ARN polimerasa dependiente de ARN (RdRp) viral, denominada VP1, interacciona con la proteína VP3 dando lugar a un complejo que facilita su encapsidación (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. *J Virol.* 73:6973-83; Tacken M et al. 2000. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-

dependent RNA polymerase, VP1. J Gen Virol. 81 Pt 1:209-18). El dominio de la proteína VP3 responsable de esta interacción está localizado en sus 16 residuos C-terminales (Maraver A et al. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus. J. Virol. 77:2459-2468). La proteína VP3 interacciona con ARN de forma inespecífica. Esta interacción no requiere la existencia de secuencias específicas en la molécula de ARN (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. Archives of Virology 148:723-744). Parece probable, al igual que lo observado con otras proteínas internas de cápsidas de otros virus, que VP3 estabilice el ARN genómico en la partícula viral.

Las vacunas convencionales empleadas para el control de la bursitis infecciosa se basan en el empleo de cepas, con diferentes grados de virulencia, del propio IBDV crecidas en cultivo celular o en huevos embrionados. Los extractos que contienen el material infeccioso son sometidos a procesos de inactivación química para producir vacunas inactivadas o bien son empleados de forma directa para producir vacunas vivas atenuadas (Sharma JM et al. 2000. Infectious bursal disease virus of chickens: pathogenesis and immunosuppression. Developmental and Comparative Immunology 24:223-235; van den Berg TP et al. 2000. Rev Sci Tech 2000, 19:509-543). Este último tipo de vacunas presenta los inconvenientes clásicos asociados con el empleo de vacunas vivas atenuadas, concretamente, el riesgo de mutaciones que reviertan la virulencia del virus o le hagan perder su inmunogenicidad.

Se han descrito vacunas sub-unidad recombinantes que contienen la proteína VP2 de IBDV expresada en diversos sistemas de expresión, por ejemplo, bacterias, levaduras o baculovirus, normalmente en forma de proteína de fusión. Los resultados obtenidos en ensayos de inmunización de pollos con dichas vacunas no han sido completamente satisfactorios.

Las cápsidas virales vacías o partículas pseudovirales (VLPs, del inglés "virus-like particles"), constituyen una alternativa al empleo de vacunas vivas atenuadas y de vacunas sub-unidad recombinantes. Las VLPs se obtienen por autoensamblaje de las sub-unidades constituyentes de la cápsida viral y mimetizan la estructura y propiedades antigénicas del virión nativo aunque carecen de material genético por lo que son incapaces de replicarse. Además de su aplicación con fines vacunales las VLPs pueden ser utilizadas como vectores de moléculas de interés biológico, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos o proteínas. A

modo ilustrativo pueden citarse VLPs de parvovirus (US 6.458.362) o del virus de la inmunodeficiencia humana (HIV) (US 6.602.705).

La morfogénesis es un proceso vital para el ciclo vírico que requiere de pasos sucesivos asociados a modificaciones en los polipéptidos precursores. Por ello, los virus han desarrollado estrategias que permiten la secuencial y correcta interacción entre cada uno de sus componentes. Una de estas estrategias, utilizada con frecuencia por virus icosaédricos, es la utilización de polipéptidos provenientes de una única poliproteína como base de sus componentes estructurales. En estos casos, el adecuado procesamiento proteolítico de dicha poliproteína juega un papel crucial en el proceso de ensamblaje.

Se ha descrito la producción de distintas VLPs de IBDV mediante expresión de la poliproteína viral empleando distintos sistemas de expresión. En 1997, Vakharia describió por primera vez la obtención de VLPs de IBDV en células de insecto (Vakharia, V. N. 1997. Development of recombinant vaccines against infectious bursal disease. *Biotechnology Annual Review* 3:151-68). Posteriormente, en 1998, el grupo de investigación al que pertenecen los inventores demostró la posibilidad de obtener VLPs de IBDV en células de mamífero (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79:1047-54). En 1999 se publicó un artículo describiendo la obtención de VLPs de IBDV en células de insecto por parte de otro grupo de investigación (Kibenge FS et al. 1999. Formation of virus-like particles when the polyprotein gene (segment A) of infectious bursal disease virus is expressed in insect cells. *Can J Vet Res* 63:49-55). Un estudio posterior, publicado por el laboratorio al que pertenecen los inventores, en colaboración con INGENASA S.A., demostró que la morfogénesis de VLPs de IBDV en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan la poliproteína de IBDV es muy ineficiente y conduce a la acumulación mayoritaria de estructuras tubulares aberrantes (Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology* 278:322-331). Estos resultados fueron posteriormente corroborados por otro grupo de investigación (Chevalier C et al. 2002. The maturation process of pVP2 requires assembly of infectious bursal disease virus capsids. *J. Virol.* 76:2384-92). En ese mismo artículo, ese grupo de investigadores demostró la posibilidad de obtener una morfogénesis eficiente mediante la expresión de una poliproteína quimérica formada por la fusión de la fase de lectura abierta (ORF) correspondiente a la proteína verde fluorescente (GFP) al extremo 3' de la fase de lectura

abierta de la poliproteína de IBDV. La expresión de esta poliproteína quimérica conduce a la formación de VLPs recombinantes de IBDV que contienen en su interior una proteína de fusión VP3-GFP recombinante, diferente a la presente en los viriones de IBDV. Por otra parte, los resultados descritos en este último trabajo no aportan información acerca del mecanismo responsable de la ineficacia del proceso morfogénico de las VLPs de IBDV en células de insecto.

Es importante resaltar que todas las VLPs descritas con anterioridad carecen de la proteína VP1, la cual se encuentra presente en los viriones de IBDV. La única referencia a la obtención de VLPs de IBDV que incluyen la VP1 ha sido realizada por investigadores del laboratorio al que pertenecen los inventores (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83) empleando como vector el virus vacunal, lo que impide la posible utilización de dichas VLPs con fines vacunales.

Los diversos procedimientos de producción de VLPs de IBDV descritos previamente adolecen de diferentes defectos que reducen o impiden su aplicabilidad para la generación de vacunas frente a IBDV ya que:

- i) la producción de VLPs de IBDV en células de mamífero se basa en el empleo de recombinantes del virus vacunal; sin embargo, ese sistema de producción tiene un costo muy elevado y, al emplear un virus recombinante capaz de infectar tanto mamíferos como aves, no reúne las condiciones de bioseguridad necesarias para su empleo como vacuna;
- ii) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto empleando sistemas de expresión convencionales, es decir baculovirus recombinantes que expresan únicamente la poliproteína viral, es muy ineficiente conduciendo a una producción de VLPs prácticamente nula;
- iii) la producción de VLPs de IBDV en células de insecto mediante la expresión de una poliproteína quimérica (formada por la fusión de la ORF correspondiente a la GFP al extremo 3' de la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV) tiene como resultado la producción de VLPs de IBDV que contienen una proteína de fusión VP3-GFP, lo que introduce un elemento proteico no presente en viriones de IBDV, de efecto desconocido y de dudosa aplicabilidad en la cadena de producción de carne de pollo para consumo humano, y

- iv) ninguno de los sistemas descritos con anterioridad para la producción de VLPs de IBDV basados en el empleo de baculovirus recombinantes permite la obtención de VLPs de IBDV que contengan todos los antígenos presentes en los viriones de IBDV.

5

COMPENDIO DE LA INVENCION

La invención se enfrenta, en general, con el problema de proporcionar nuevas vacunas eficaces y seguras frente al virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV).

La solución proporcionada por esta invención se basa en que es posible obtener VLPs de IBDV correctamente ensambladas mediante la expresión simultánea de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura abiertas (ORFs) independientes en células hospedadoras apropiadas. En una realización particular, la expresión de dichas ORFs está controlada por promotores diferentes. Dichas VLPs de IBDV están formadas por autoensamblaje de las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV, por lo que contienen todos elementos proteicos antigénicamente relevantes presentes en los viriones purificados e infectivos de IBDV, y, por ese motivo, se denominan "VLPs completas de IBDV" en esta descripción. Dado que dichas VLPs completas de IBDV contienen todos los elementos proteicos antigénicamente relevantes presentes en los viriones purificados e infectivos de IBDV para inducir una respuesta inmune o antigénica, dichas VLPs completas de IBDV pueden ser utilizadas con fines terapéuticos, por ejemplo, en la elaboración de vacunas, tales como vacunas para proteger aves de la infección causada por IBDV o en la elaboración de vectores para terapia génica; con fines de diagnóstico, etc.

Los resultados obtenidos ponen de manifiesto que: (i) la proteína VP3 de IBDV, expresada en células de insecto a partir de la expresión de la poliproteína viral, sufre un procesamiento proteolítico que elimina los últimos 13 restos de aminoácidos de su extremo C-terminal; (ii) la proteína VP3 resultante (denominada VP3T) es incapaz de formar oligómeros, lo que produce un bloqueo prácticamente total del proceso morfogenético que induce una producción prácticamente nula de VLPs; y (iii) la asociación de la proteína VP3 con la proteína VP1 protege a la primera (VP3) frente al procesamiento proteolítico.

Estos resultados han permitido diseñar una nueva estrategia o procedimiento para la producción eficiente de VLPs completas de IBDV y que, a diferencia de los métodos descritos previamente, presentan una morfogénesis eficaz a la vez que se evita la presencia en éstas de elementos proteicos heterólogos inexistentes en partículas virales purificadas.

Esta estrategia se basa en la utilización de un sistema o vector de expresión génica que permite la co-expresión de la poliproteína viral y de la proteína VP1 como ORFs independientes, lo que garantiza la presencia de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV durante el proceso de ensamblaje de las VLPs completas de IBDV. En esas
5 condiciones, las proteínas VP3 y VP1 forman complejos estables que impiden la degradación proteolítica de VP3, asegurando su correcto funcionamiento, y conducen a la incorporación de VP1 en las VLPs de IBDV.

En una realización particular, dicho sistema de expresión génica se basa en el empleo de un baculovirus recombinante dual que expresa simultáneamente la poliproteína viral y la
10 proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes controladas por promotores diferentes. En otra realización particular, dichas VLPs completas de IBDV se obtienen como resultado de la co-infección de células hospedadoras, tales como células de insecto, con dos baculovirus recombinantes, uno de ellos capaz de expresar la poliproteína viral y el otro la proteína VP1 de IBDV.

15 Las vacunas obtenidas utilizando dichas VLPs completas de IBDV presentan numerosas ventajas ya que se evita la manipulación de material altamente infeccioso, se previene el riesgo potencial de aparición de nuevos mutantes de IBDV y se elimina el uso de virus vivo en las explotaciones avícolas, previniéndose de este modo el riesgo de diseminación de cepas vacunales de IBDV al Medio Ambiente.

20 Por consiguiente, un aspecto de la presente invención se relaciona con una VLP completa de IBDV compuesta por ensamblaje de las proteínas PVX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV. Dicha VLP completa de IBDV presenta actividad antigénica o inmunogénica frente a la infección causada por IBDV.

Un aspecto adicional de esta invención se relaciona con un procedimiento para la
25 producción de dichas VLPs completas de IBDV proporcionadas por esta invención, basado en la co-expresión génica de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV como dos ORFs independientes en células hospedadoras apropiadas. En una realización particular, la expresión de dichas ORFs está controlada por promotores diferentes.

Las construcciones génicas, los sistemas de expresión y las células hospedadoras
30 desarrolladas para la puesta en práctica de dicho procedimiento de producción de dichas VLPs completas de IBDV, así como su empleo para la producción de dichas VLPs completas de IBDV, constituyen aspectos adicionales de la presente invención.

Dichas VLPs completas de IBDV tienen la capacidad de inmunizar animales, en particular, aves, frente a la enfermedad aviar causada por el IBDV así como la capacidad de vectorizar o vehiculizar moléculas de interés biológico, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, etc. En una realización particular, dichas VLPs completas de IBDV pueden ser utilizadas en la elaboración de vacunas para proteger aves frente al virus inductor de la enfermedad aviar conocida como bursitis infecciosa (IBDV). Prácticamente cualquier ave, preferentemente aquellas especies aviares de interés económico, por ejemplo, pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices, avestruces, etc., pueden ser inmunizadas frente a la infección causada por IBDV con las vacunas proporcionadas por esta invención. En otra realización particular, dichas VLPs completas de IBDV pueden vehiculizar, en su interior, productos con actividad biológica, por ejemplo, ácidos nucleicos, péptidos, proteínas, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas en la elaboración de vectores para terapia génica.

Por tanto, en otro aspecto adicional, la presente invención se relaciona con el empleo de dichas VLPs completas de IBDV en la elaboración de medicamentos, tales como vacunas y vectores para terapia génica. Dichas vacunas y vectores constituyen aspectos adicionales de la presente invención. En una realización particular, dicha vacuna es una vacuna útil para proteger aves de la infección causada por IBDV. En una realización concreta, dichas aves seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces, preferentemente, pollos.

En otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de baculovirus recombinantes útiles para la producción de VLPs completas de IBDV. En una realización particular, los baculovirus recombinantes obtenidos son duales, es decir, un mismo baculovirus recombinante es capaz de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral y la proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes y controladas por promotores de baculovirus diferentes. En otra realización particular, se obtienen unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor y unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la proteína VP1 de IBDV a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende la ORF correspondiente a la VP1 de IBDV bajo el control de un promotor, igual o diferente al que regula la expresión de la poliproteína viral en dichos baculovirus recombinantes capaces de

expresar la poliproteína viral. Los baculovirus recombinantes resultantes constituyen un aspecto adicional de la presente invención. Dichos rBVs pueden ser utilizados para la producción de VLPs completas de IBDV.

5 BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

La Figura 1 muestra el efecto de la delección C-terminal de la VP3 de IBDV en la morfogénesis de VLPs. La Figura 1A es un diagrama que representa de forma gráfica los genes derivados de IBDV expresados por los diferentes recombinantes del virus vacunal [VT7/Poly (Poly), descrito por Fernández-Arias et al. (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. J. Gen. Virol. 79:1047-1054), VT7/Poly Δ 907-1012 (Poly Δ 907-1012) y VT7/VP3 (VP3)] empleados para comprobar el efecto de la delección del extremo C-terminal de VP3 en la formación de VLPs de IBDV en células de mamífero. VT7/Poly (Poly) expresa la poliproteína completa. VT7/Poly Δ 907-1012 (Poly Δ 907-1012) expresa una forma
10 delecionada de la poliproteína que carece de los 150 residuos C-terminales. VT7/VP3 (VP3) expresa la proteína VP3 completa. La Figura 1B ilustra el efecto de la delección del extremo C-terminal de la poliproteína de IBDV sobre la distribución subcelular de las proteínas VPX (pVP2) y VP2, y recoge las imágenes digitales de microscopía confocal obtenidas a partir de células infectadas con los recombinantes VT7/Poly (Poly), VT7/Poly Δ 907-1012 (Poly Δ 907-
15 1012) y VT7/VP3 (VP3), respectivamente. Las células fueron fijadas a las 24 horas post-infección (h.p.i.) e incubadas con suero de conejo anti-VPX/2 (anti-pVP2/VP2) de IBDV y con suero de rata anti-VP3 de IBDV seguido por incubación con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 488 (verde) y con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de rata acoplada a Alexa 488 (rojo). La Figura 1C muestra el efecto de la delección del
20 extremo C-terminal de la poliproteína de IBDV sobre el ensamblaje de las cápsidas; extractos de células infectadas con VT7/Poly (Poly), VT7/Poly Δ 907-1012 (Poly Δ 907-1012) o coinfectadas con VT7/Poly Δ 907-1012 (Poly Δ 907-1012) y VT7/VP3 (VP3) fueron sometidas a fraccionamiento en gradiente de sacarosa. Una alícuota de cada una de las fracciones fue colocada sobre una rejilla de microscopio electrónico, tefida negativamente y
25 visualizada mediante microscopía electrónica. Las imágenes representan los ensamblados detectados en fracciones equivalentes de los diferentes gradientes.
30

La Figura 2 muestra los resultados de un análisis comparativo mediante Western blot de la proteína VP3 de IBDV expresada en diferentes sistemas de expresión; extractos de

células infectadas con IBDV, VT7/Poly y FB/Poly, respectivamente, fueron sometidas a electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE) y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3 de IBDV, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa (HRPO: horse radish peroxidase). La señal
5 fue detectada mediante ECL (Enhanced Chemiluminescence). Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular.

La Figura 3 muestra la caracterización de la proteólisis C-terminal de la proteína VP3 de IBDV expresada en células de insecto. La Figura 1A es un diagrama que representa de forma gráfica el gen his-VP3 que contiene una cola de histidinas fusionado al extremo N-
10 terminal de VP3 expresado por el baculovirus recombinante FB/his-VP3 [en ocasiones denominado en esta descripción FB/his-VP3 wt (tipo salvaje)]. Se indica la secuencia correspondiente a la cola de histidinas y el primer residuo aminoacídico correspondiente a VP3 (subrayado). Muestras correspondientes a extractos totales de células H5 (GIBCO), también identificadas en esta descripción como células H5, infectadas con FB/his-VP3, o a
15 la proteína his-VP3 purificada por afinidad fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3 (Figura 1B) o anti-cola de histidinas (anti-his tag) (Figura 1C) seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular.

20 La Figura 4 muestra la localización del sitio de corte proteolítico de la proteína VP3 de IBDV en células de insecto. La Figura 1A es un diagrama que representa de forma gráfica el grupo de proteínas his-VP3 delecionadas empleadas en la determinación de la posición del sitio de corte proteolítico de la proteína VP3 de IBDV en células de insecto. La Figura 1B muestra el resultado de un análisis mediante Western blot de las diferentes proteínas his-VP3
25 delecionadas expresadas en células H5 y purificadas por cromatografía de afinidad a metales (IMAC). Extractos de cultivos de células H5 infectados con cada uno de los baculovirus recombinantes fueron sometidos a purificación en columnas de afinidad HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech). Las proteínas purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con
30 inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de las bandas inmunoreactivas y las de los marcadores de peso molecular. Las flechas indican la posición de la proteína completa (F) y la correspondiente a la forma proteolizada (T).

La Figura 5 ilustra que el procesamiento proteolítico de VP3 de IBDV en células de insecto produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del extremo C-terminal de his-VP3. Extractos de células H5 infectadas con FB/his-VP3 fueron sometidos a purificación mediante IMAC y la proteína purificada resultante fue analizada mediante espectrometría de masas por triplicado. La Figura 5A muestra los resultados de uno de esos experimentos. Se determinó la presencia de dos polipéptidos de 32.004 y 30.444 Da, respectivamente, lo que demuestra que el procesamiento proteolítico produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del extremo C-terminal de his-VP3, tamaño que encaja con la masa molecular (1.576 Da) correspondiente a los 13 residuos C-terminales de la VP3 de IBDV cuya secuencia se muestra en la Figura 5B.

La Figura 6 muestra el efecto de la co-expresión de VP1 de IBDV sobre la proteólisis de his-VP3. La Figura 6A muestra la detección de complejos VP3/VP1. Células H5 fueron infectadas con FB/his-VP3 o con FBD/his-VP3-VP1. A las 72 h.p.i. las células fueron recogidas y los extractos correspondientes sometidos a purificación en columnas de afinidad HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech). Muestras correspondientes a extractos totales (T) o a proteínas purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE. Los geles fueron posteriormente teñidos con nitrato de plata. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La Figura 6B muestra los resultados de un análisis mediante Western blot de extractos de células H5 infectadas con FB/his-VP3, FBD/his-VP3-VP1, o coinfectadas con FB/his-VP3 y FB/VP1, respectivamente. Las células infectadas fueron recogidas a las 72 h.p.i. y homogeneizadas. Los extractos correspondientes fueron sometidos a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

La Figura 7 ilustra la localización del dominio de oligomerización. La Figura 7A es un diagrama que representa de forma gráfica el grupo de proteínas his-VP3 delecionadas empleadas en la determinación de la posición del dominio de oligomerización de VP3. Las regiones delecionadas se indican con la línea de puntos. El nombre de cada mutante indica la localización de los residuos aminoacídicos eliminados en la secuencia de la proteína VP3 de IBDV. La Figura 7B muestra la detección de oligómeros de VP3. Las diferentes proteínas de deleción de his-VP3, purificadas por afinidad en columnas HiTrap (Amersham Pharmacia Biotech), fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a

peroxidasa. La Figura 1C muestra los resultados de un análisis por Western blot. Las muestras descritas en el apartado anterior (Figura 7B) fueron sometidas a electroforesis no desnaturalizante seguida de análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La Figura 7D muestra la detección de oligómeros de VP3 producidos por mutantes de delección C-terminal de VP3. Las proteínas fueron purificadas fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. La señal fue detectada mediante ECL. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular.

La Figura 8 muestra la determinación del efecto de la coexpresión de VP1 de IBDV sobre el procesamiento proteolítico de VP3 de IBDV y la distribución subcelular de las proteínas de la cápsida. La Figura 8A ilustra la detección de las proteínas VP1 y VP3 de IBDV acumuladas en células H5 infectadas con FB/Poly y FBD/Poly-VP1, respectivamente. Células infectadas fueron recogidas a 24, 48 y 72 h.p.i. Las muestras fueron sometidas a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP3 o anti-VP1, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. Se indica la posición de los marcadores de peso molecular. La distribución subcelular de las proteínas VPX/2 (pVP2/VP2) y VP3 en células infectadas con FB/Poly y FBD/Poly-VP1 fue analizada por microscopía confocal (Figura 8B). Las células fueron fijadas a las 60 h.p.i., y, a continuación, incubadas con suero de conejo anti-VPX (anti-pVP2) y suero de rata anti-VP3 seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de conejo acoplada a Alexa 488 (verde) y con inmunoglobulina de cabra anti-IgG de rata acoplada a Alexa 488 (rojo). Las flechas indican la posición de los aviroplasmas formados por VPX/2 (pVP2/VP2) y VP3.

La Figura 9 ilustra la caracterización de las estructuras formadas por expresión de la poliproteína de IBDV en células infectadas con FB/Poly-VP1. La Figura 9A es un conjunto de micrografías de las estructuras obtenidas en las distintas fracciones. Células H5 fueron infectadas con FB/Poly (Poly) o con FBD/Poly-VP1 (Poly-VP1). A las 90 h.p.i. las células fueron recogidas y los extractos correspondientes empleados para la purificación de estructuras mediante gradientes de sacarosa. Después de la centrifugación se recogieron 6 alicuotas de 2 ml. Una parte de cada alicuota fue colocada sobre una rejilla, teñida negativamente con acetato de uranilo, y analizada mediante observación al microscopio electrónico. Las fracciones #1 corresponden al fondo de los gradientes. No se muestran las

fracciones #6, que contenían proteína soluble y estructuras desensambladas. La barra corresponde a 200 nm. La Figura 9B es una micrografía que muestra VLPs purificadas a partir de células infectadas con FBD/Poly-VP1. La imagen corresponde a la fracción#5 del gradiente obtenido a partir de células infectadas con FBD/Poly-VP1. Los recuadros
5 ampliados muestran 2 VLPs a una amplificación mayor. La Figura 9C muestra la caracterización de los polipéptidos presentes en la fracción#5 de ambos gradientes. Una alícuota de la fracción#5 de cada gradiente fue sometida a SDS-PAGE y análisis por Western blot empleando suero de conejo anti-VP1, anti-VPX (anti-pVP2/VP2) o anti-VP3, seguido de incubación con inmunoglobulina de cabra acoplada a peroxidasa. Se indica la
10 posición de VPX (pVP2), VP2, VP3 completa (F) y VP3 proteolizada (T).

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

En un primer aspecto, la invención proporciona una cápsida viral vacía completa del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV), en adelante VLP completa
15 (VLPs completas, en plural) de IBDV de la invención, caracterizada porque contiene todas las proteínas presentes en viriones purificados e infectivos de IBDV, concretamente, las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV.

El término "IBDV", tal como se utiliza en la presente invención, se refiere a las diferentes cepas de IBDV pertenecientes a cualquiera de los serotipos (1 ó 2) conocidos [a título ilustrativo véase la revisión realizada por van den Berg TP, Eterradossi N, Toquin D, Meulemans G., en *Rev Sci Tech* 2000 19:509-43].
20

Los términos "poliproteína viral" o "poliproteína de IBDV" se utilizan indistintamente en esta descripción y se refieren al producto resultante de la expresión del segmento A del genoma de IBDV cuyo procesamiento proteolítico da lugar a las proteínas
25 VPX (pVP2), VP3 y VP4, e incluyen a las diferentes formas de las poliproteínas representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Sánchez y Rodríguez (1999) (Sánchez AB & Rodríguez JF. Proteolytic processing in infectious bursal disease virus: identification of the polyprotein cleavage sites by site-directed mutagenesis. *Virology*. 1999 Sep 15; 262(1):190-
30 199) así como proteínas sustancialmente homólogas a dicha poliproteína de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dicha poliproteína de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%, más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

El término "proteína VP1 de IBDV" se refiere al producto resultante de la expresión del segmento B del genoma de IBDV e incluye a las diferentes formas de las proteínas VP1 representativas de cualquiera de las mencionadas cepas de IBDV [NCBI protein databank], de acuerdo con la definición realizada por Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-
5 dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83) así como proteínas sustancialmente homólogas a dicha proteína VP1 de IBDV, es decir, proteínas cuyas secuencias de aminoácidos tienen un grado de identidad, respecto a dicha proteína VP1 de IBDV, de, al menos, un 60%, preferentemente de, al menos un 80%,
10 más preferentemente de, al menos, un 90% y, aún más preferentemente de, al menos, un 95%.

Las proteínas VPX (pVP2), VP2 y VP3 de IBDV presentes en las VLPs completas de IBDV de la invención pueden ser cualquiera de las proteínas VPX, VP2 y VP3 representativa de cualquier cepa de IBDV, obtenidas por procesamiento proteolítico de la
15 poliproteína viral, por ejemplo, las proteínas VPX, VP2 y VP3 de IBDV cepa Soroa [NCBI, número de acceso AAD30136].

La proteína VP1 de IBDV presente en las VLPs completas de IBDV de la invención puede ser cualquier proteína VP1 representativa de cualquier cepa de IBDV, por ejemplo, la proteína VP1, longitud completa, de IBDV cepa Soroa, cuya secuencia de aminoácidos se
20 muestra en la SEQ. ID. NO: 2.

En una realización particular, las VLPs completas de IBDV de la invención presentan un diámetro de 65-70 nm y un contorno poligonal indistinguible de los viriones de IBDV.

Las VLPs completas de IBDV de la invención pueden obtenerse mediante la expresión simultánea de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV en células
25 hospedadoras apropiadas. Dichas células hospedadoras apropiadas son células que contienen la secuencia de nucleótidos codificante de la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor apropiado y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control de otro promotor apropiado, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes. En una realización particular, dichas células
30 hospedadoras apropiadas son células transformadas, transfectadas o infectadas con un sistema de expresión adecuado, tal como (1) un sistema de expresión que comprende una construcción génica, en donde dicha construcción génica comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor y la

secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control de otro promotor distinto al que está unido operativamente a la secuencia de nucleótidos que codifica la poliproteína viral, o bien, alternativamente, (2) un sistema de expresión que comprende una primera construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que
5 codifica para la poliproteína de IBDV, y una segunda construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas bajo el control de un promotor apropiado. En una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula de insecto y dichos promotores son promotores de baculovirus.

Por consiguiente, en otro aspecto, la invención se relaciona con una construcción
10 génica que comprende la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha poliproteína de IBDV y la secuencia de nucleótidos que codifica para dicha proteína VP1 de IBDV, en forma de dos ORFs independientes cuya expresión viene regulada por sendos promotores diferentes que regulan la expresión génica de cada una de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV. Por tanto, la invención proporciona una construcción génica que comprende
15 (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que
20 comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor. El empleo de dichos promotores distintos permite la regulación independiente y simultánea de la expresión génica de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV.

Una característica de la construcción génica proporcionada por esta invención es que
25 comprende las secuencias de nucleótidos que codifican para todos los elementos proteicos presentes en los viriones purificados e infectivos de IBDV, concretamente, las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1.

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “ORFs (o fases de lectura abiertas) correspondientes a la poliproteína de IBDV” u “ORF (fase de lectura abierta)
30 correspondiente a la proteína VP1 de IBDV” incluye, además de las secuencias de nucleótidos de dichas ORFs, otras ORFs análogas a las mismas codificantes de la poliproteína viral y de la VP1 de IBDV. El término “análogo/a”, tal como aquí se utiliza, pretende incluir cualquier secuencia de nucleótidos que puede ser aislada o construida sobre

la base de la secuencia de nucleótidos codificantes de la poliproteína viral y la VP1 de IBDV, por ejemplo, mediante la introducción de sustituciones de nucleótidos conservativas o no conservativas, incluyendo la inserción de uno o más nucleótidos, la adición de uno o más nucleótidos en cualquiera de los extremos de la molécula o la delección de uno o más nucleótidos en cualquier extremo o en el interior de la secuencia. En general, una secuencia de nucleótidos análoga a otra secuencia de nucleótidos es sustancialmente homóloga a dicha secuencia de nucleótidos. En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión “sustancialmente homóloga” significa que las secuencias de nucleótidos en cuestión tienen un grado de identidad, a nivel de nucleótidos, de, al menos, un 60%, ventajosamente de, al menos, un 70%, preferentemente de, al menos, un 80%, más preferentemente de, al menos, un 85%, aún más preferentemente de, al menos, un 90% y, todavía más preferentemente de, al menos, un 95%.

Los promotores que pueden ser utilizados en la puesta en práctica de la presente invención comprenden, en general, una secuencia de ácido nucleico a la que se une la ARN polimerasa para iniciar la transcripción del ARNm y expresar dichas ORFs correspondientes a la poliproteína viral y a la proteína VP1 de IBDV en células hospedadoras apropiadas. Aunque prácticamente cualquier promotor que satisfaga esas condiciones puede ser utilizado para la puesta en práctica de la presente invención, por ejemplo, promotores de origen viral, bacteriano, de levaduras, animal, vegetal, etc., en una realización particular, dichos promotores son promotores virales, por ejemplo, promotores de baculovirus.

La expresión de cada una de dichas secuencias de nucleótidos codificantes para dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV, en forma de dos ORFs independientes, viene regulada por sendos promotores diferentes que regulan la expresión génica de cada una de dichas proteínas. En una realización particular, la expresión génica de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV se lleva a cabo en células de insecto infectadas o co-infectadas con baculovirus recombinantes (rBVs) que contienen las secuencias de nucleótidos codificantes de dichas proteínas, bien en un único rBV (rBV dual) o bien en dos rBV (en cuyo caso uno de dichos rBV contiene la secuencia codificante de la poliproteína de IBDV y el otro la secuencia codificante de la proteína VP1 de IBDV) bajo el control de promotores de baculovirus.

Prácticamente cualquier promotor de baculovirus puede ser utilizado siempre y cuando sea capaz de regular de forma eficaz la expresión de la secuencia codificante a la que está operativamente unida. A modo ilustrativo, dicho primer promotor de baculovirus puede

ser el promotor de la proteína p10 del baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNPV), el promotor de la polihedrina del baculovirus AcMNPV, etc. y dicho segundo promotor de baculovirus puede ser el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y el promotor de la polihedrina de AcMNPV. De forma más concreta, en una
5 realización particular, dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV, mientras que en otra realización particular, dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la proteína 10 de AcMNPV.

10 En una realización particular, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende:

- (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos
15 que comprende un primer promotor de un baculovirus, y
- (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos
20 que comprende un segundo promotor de un baculovirus,

en donde dichos primer y segundo promotores de baculovirus son distintos.

El empleo de promotores diferentes de baculovirus permite la regulación independiente y simultánea de la expresión génica de dichas poliproteína y proteína VP1 de
25 IBDV en células de insecto.

En una realización concreta, la construcción génica proporcionada por esta invención comprende la secuencia codificante de la poliproteína de IBDV bajo el control de un primer promotor de baculovirus y la secuencia codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control de un segundo promotor de baculovirus, distinto al primero, tal como la construcción
30 génica denominada "Poly-VP1" en esta descripción, que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ. ID. NO: 1; dicha construcción génica Poly-VP1 contiene la secuencia codificante de la poliproteína de IBDV bajo el control del promotor de

la polihedrina de AcMNV y la secuencia codificante de la proteína VP1 de IBDV bajo el control del promotor de la proteína p10 de AcMNV.

En otro aspecto, la invención proporciona un sistema o vector de expresión seleccionado entre:

5

a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor;

10

15 y

b) un sistema de expresión que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha segunda construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor.

20

25

En el segundo caso [b)], dicho primer promotor y dicho segundo promotor, al estar en construcciones génicas diferentes, pueden ser iguales o diferentes entre sí.

30

Las características de las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y a la proteína VP1 de IBDV han sido previamente definidas en relación con la construcción génica proporcionada por esta invención. Los promotores que pueden ser utilizados en el

sistema de expresión proporcionado por esta invención han sido previamente definidos en relación con la construcción génica proporcionada por esta invención. A modo ilustrativo, dichos promotores pueden ser promotores de origen viral, bacteriano, de levaduras, animal, vegetal, etc.

- 5 En una realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende una construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende
- 10 un primer promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de
- 15 AcMNV, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

- En otra realización particular, el sistema de expresión proporcionado por esta invención comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha
- 20 primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de
- 25 transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, tal como, por ejemplo, el promotor de la proteína p10 de AcMNV o el promotor de la polihedrina de AcMNV. En esta realización particular, dicho
- 30 primer promotor de baculovirus y dicho segundo promotor de baculovirus, al estar en construcciones génicas diferentes, pueden ser iguales o diferentes entre sí.

Los elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, presentes en el sistema de expresión proporcionado por esta invención incluyen las secuencias

necesarias o apropiadas para la transcripción y su regulación adecuada en tiempo y lugar, por ejemplo, señales de inicio y terminación, sitios de corte, señales de poliadenilación, origen de replicación, activadores transcripcionales (enhancers), silenciadores transcripcionales (silencers), etc.

5 Prácticamente cualquier sistema o vector de expresión apropiado puede ser utilizado en la generación del sistema de expresión proporcionado por esta invención dependiendo de las condiciones y necesidades de cada caso concreto. A modo ilustrativo, dichos sistemas o vectores de expresión apropiados pueden ser plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales
10 basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos, virus, que pueden contener, además, si se desea, un origen de replicación heterólogo, por ejemplo, bacteriano, para que pueda ser amplificado en bacterias o levaduras, así como un marcador utilizable para seleccionar las células transfectadas, etc., preferentemente, plásmidos, bácmidos o virus.

Estos sistemas o vectores de expresión pueden ser obtenidos por métodos
15 convencionales conocidos por los técnicos en la materia [Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory] y forman parte de la presente invención. En una realización particular, dicho sistema o vector de expresión es un plásmido, tal como el plásmido denominado pFBD/Poly-VP1 en esta descripción, o un bácmido, tal como el bácmido recombinante denominado
20 Bac/pFBD/Poly-VP1 en esta descripción, que contienen la construcción génica Poly-VP1 previamente definida, o bien un virus, tal como el baculovirus recombinante (rBV) denominado FBD/Poly-VP1 en esta descripción, que contiene la construcción génica Poly-VP1 y expresa durante su ciclo de replicación ambas proteínas (poliproteína y VP1 de IBDV) simultáneamente en células de insecto, o los rBVs que expresan la poliproteína de
25 IBDV y la proteína VP1 de IBDV, de forma separada y simultánea, cuando co-infectan células de insecto, obteniéndose VLPs completas de IBDV.

En otro aspecto, la invención proporciona una célula hospedadora que contiene la secuencia de nucleótidos codificante de la poliproteína de IBDV y la secuencia de nucleótidos codificante de la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas bajo el control de un
30 promotor apropiado que permite la regulación simultánea e independiente de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV, bien en una única construcción génica (en cuyo caso los promotores unidos a cada una de dichas secuencias codificantes serían diferentes entre sí) o bien en dos construcciones génicas diferentes. Por tanto, dicha célula hospedadora puede

contener una construcción génica proporcionada por esta invención o bien un sistema de expresión proporcionado por esta invención.

La célula hospedadora proporcionada por esta invención puede ser una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión
5 proporcionado por esta invención.

En una realización particular la célula hospedadora proporcionada por esta invención es una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de
10 traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende
15 un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor.

Alternativamente, en otra realización particular, dicha célula hospedadora es una célula hospedadora transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende (1) una primera construcción génica,
20 operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha segunda construcción génica
25 comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor; en esta realización particular, dicho primer promotor y dicho segundo promotor, al estar en construcciones génicas diferentes, pueden ser iguales o diferentes entre
30 sí.

Aunque, en cualquiera de las realizaciones mencionadas previamente, virtualmente cualquier promotor podría ser utilizado, en la práctica se prefiere que dichos promotores sean útiles en bacterias, levaduras, virus, células de animales, por ejemplo, en células de

mamífero, células aviares, células de insecto, etc.; en una realización particular, dichos promotores son promotores de baculovirus, tales como, por ejemplo, el promotor de la polihedrina de AcMNV o el promotor de la proteína p10 de AcMNV.

Prácticamente cualquier célula hospedadora susceptible de ser transformada, transfectada o infectada por un sistema de expresión proporcionado por esta invención puede ser utilizada, por ejemplo, bacterias, células de mamífero, células aviares, células de insecto, etc.

En una realización particular, dicha célula hospedadora es una bacteria transformada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas operativamente unida a un promotor diferente, tal como la construcción génica identificada como Poly-VP1. Un cultivo de bacterias *Escherichia coli* cepa DH5, transformadas con dicha construcción génica Poly-VP1, e identificadas como DH5-pFBD/Poly-VP1 ha sido depositado en la CECT con el número de depósito CECT 5777.

Alternativamente, dicha célula hospedadora es una célula de insecto. Las células de insecto son adecuadas cuando el sistema de expresión comprende uno o dos rBVs. El empleo de rBVs es ventajoso por cuestiones de bioseguridad relacionadas con el rango de huésped de los baculovirus, incapaces de replicar en otros tipos celulares que no sean de insecto.

Por tanto, en una realización particular, la invención proporciona una célula hospedadora, tal como una célula de insecto, infectada con un sistema de expresión proporcionado por esta invención, tal como un rBV, que comprende una construcción génica proporcionada por esta invención que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV, cada una de ellas operativamente unida a un promotor diferente de baculovirus, tal como la construcción génica identificada como Poly-VP1.

En otra realización particular, la invención proporciona una célula hospedadora, tal como una célula de insecto, co-infectada con un sistema de expresión que comprende (1) un primer rBV que comprende una construcción génica que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y (2) un segundo rBV que comprende una

construcción génica que comprende la secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, estando cada una de dichas secuencias codificantes operativamente unida a un promotor, igual o diferente entre sí, de baculovirus.

En otro aspecto, la invención proporciona un procedimiento para la producción de
5 VLPs completas de IBDV de la invención que comprende cultivar una célula hospedadora proporcionada por esta invención que contiene una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, bien en una única construcción génica o bien en dos construcciones génicas diferentes, y que expresa
10 simultáneamente dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV, y, si se desea, recuperar dichas VLPs completas de IBDV de la invención.

En una realización particular, dicha célula hospedadora proporcionada por esta invención es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión adecuado proporcionado por esta invención, tal como un sistema de expresión que
15 comprende una construcción génica proporcionada por esta invención, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a
20 una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho primer promotor; o bien, alternativamente, con un sistema de expresión proporcionado por esta invención que comprende (1) una primera construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y (2) una segunda construcción génica que
25 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, estando cada una de dichas secuencias de nucleótidos que comprenden las ORFs correspondientes a la poliproteína viral y a la proteína VP1 de IBDV bajo el control de sendas secuencias de nucleótidos que comprenden sendos promotores, iguales o diferentes entre sí.

30 Dicho procedimiento comprende, por tanto, la co-expresión génica simultánea de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV como dos ORFs independientes. Tras la expresión simultánea de dichas poliproteína viral y proteína VP1 en dichas células, la poliproteína es procesada proteolíticamente y las proteínas resultantes se ensamblan y

forman las VLPs completas de IBDV de la invención, constituidas por VPX, VP2, VP3 y VP1, las cuales pueden ser aisladas o retiradas del medio, y, si se desea, purificadas. El aislamiento y purificación de dichas VLPs completas de IBDV de la invención puede realizarse por métodos convencionales, por ejemplo, mediante fraccionamiento en gradientes de sacarosa.

Aunque la célula hospedadora a cultivar puede ser cualquiera de las definidas previamente, en una realización particular, dicha célula hospedadora es una célula de insecto.

Por tanto, en una realización concreta, la co-expresión génica simultánea de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV en una célula hospedadora apropiada, tal como una célula de insecto, se realiza mediante el empleo de un rBV dual que permite la expresión simultánea de dichas proteínas a partir de dos ORFs independientes, cada una de ellas bajo el control de un promotor de baculovirus diferente capaz de regular simultánea e independientemente la expresión de dichas proteínas en células de insecto. En este caso, la producción de las VLPs completas de IBDV de la invención puede realizarse mediante un procedimiento que comprende, en primer lugar, la obtención de un sistema de expresión génica constituido por un rBV dual que contiene una construcción génica que comprende simultáneamente las ORFs correspondientes a dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV, tal como el rBV denominado FBD/Poly-VP1 en esta descripción, o bien, alternativamente, la obtención de un rBV que contiene una construcción génica que comprende la ORF correspondiente a la poliproteína de IBDV y la obtención de otro rBV que contiene una construcción génica que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV, seguido de la infección de células de insecto con dicho sistema de expresión basado en dicho(s) rVB(s), expresión de las proteínas recombinantes y, si se desea, aislamiento de las VLPs completas de IBDV de la invención formadas, y, opcionalmente, purificación posterior de dichas VLPs completas de IBDV de la invención.

De forma más concreta, en una realización particular, el procedimiento para la obtención de VLPs completas de la invención se caracteriza porque la célula hospedadora es una célula de insecto y comprende las etapas de:

- a) preparar un sistema de expresión proporcionado por esta invención constituido por (1) un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs

- correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a un promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y por (2) un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a un promotor de un baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción;
- b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.

Asimismo, en otra realización particular, el procedimiento para la obtención de VLPs completas de la invención se caracteriza porque la célula hospedadora es una célula de insecto y comprende las etapas de:

- a) preparar un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante dual que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de

control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicho promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus;

b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);

c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y

d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.

La construcción de un rBV dual que permite la expresión de forma simultánea de la poliproteína de IBDV y de la proteína VP3 de IBDV puede ser realizada por un experto en la materia en base a lo aquí descrito y al estado de la técnica sobre esta tecnología (Cold Spring Harbor, N.Y.; Leusch MS, Lee SC, Olins PO. 1995. A novel host-vector system for direct selection of recombinant baculoviruses (bacmids) in *Escherichia coli*. Gene 160:191-4; Luckow VA, Lee SC, Barry GF, Olins PO. 1993. Efficient generation of infectious recombinant baculoviruses by site-specific transposon-mediated insertion of foreign genes into a baculovirus genome propagated in *Escherichia coli*. J Virol 67:4566-79). De forma similar puede obtenerse un rBV que contiene la construcción génica que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV y un rBV que contiene una construcción génica que comprende la ORF correspondiente a la proteína VP1 de IBDV.

En relación con esto, la invención proporciona un procedimiento para la obtención de un rBV dual que permite la expresión simultánea de la poliproteína de IBDV y de la proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes y controladas, cada una de ellas, por un promotor de baculovirus diferente, en células de insecto, que comprende:

a) construir un plásmido portador de una construcción génica que contiene (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a

la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de un baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus y permiten la regulación simultánea de la expresión génica de dichas poliproteína y proteína VP1 de IBDV;

5

b) obtener un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido obtenido en a); y

10

c) obtener un baculovirus recombinante dual, que permite la expresión simultánea de las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante transformación de células de insecto con el bácmido recombinante de b).

15

Tal como se utiliza en esta descripción, el término “bacterias competentes” se refiere a bacterias que pueden contener el genoma de un baculovirus, por ejemplo, AcMNV, opcionalmente modificado genéticamente, que permite la recombinación con plásmidos donadores.

20

En una realización particular, dicho procedimiento de obtención de rBVs duales se caracteriza porque:

25

- dicha primera secuencia promotora de baculovirus comprende el promotor de la proteína p10 de AcMNV y dicha segunda secuencia promotora de baculovirus comprende el promotor de la polihedrina de AcMNPV, o viceversa;
- el plásmido obtenido en a) es el identificado como pFBD/Poly-VP1 en esta descripción;
- las bacterias competentes transformadas en b) son *Escherichia coli* DH10Bac;
- el bácmido recombinante obtenido en b) es el identificado como Bac/pFBD/Poly-VP1 en esta descripción; y
- el rBV dual obtenido es el identificado como FBD/Poly-VP1.

30

El rBV dual así obtenido puede ser utilizado, si se desea, para obtener VLPs completas de IBDV de la invención. Para ello, se infectan células de insecto con dicho rBV

dual. Prácticamente, cualquier célula de insecto puede ser utilizada; no obstante, en una realización particular, dichas células de insecto son células H5 o células de *Spodoptera frugiperda* Sf9.

Alternativamente, como se ha mencionado antes, pueden obtenerse VLPs completas de la invención mediante la infección conjunta (co-infección) de células de insecto con un rBV que permite la expresión de la poliproteína de IBDV en células de insecto y con un rBV que permite la expresión de la proteína VP1 de IBDV en células de insecto. Dichos rBVs pueden obtenerse según lo mencionado previamente. Prácticamente, cualquier célula de insecto puede ser utilizada; no obstante, en una realización particular, dichas células de insecto son células H5 o células de *Spodoptera frugiperda* Sf9.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con un procedimiento para la producción de rBVs útiles para la producción de VLPs completas de IBDV. En una realización particular, los baculovirus recombinantes obtenidos son duales, es decir, un mismo baculovirus recombinante es capaz de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral y la proteína VP1 de IBDV a partir de dos ORFs independientes y controladas por promotores diferentes de baculovirus. La expresión simultánea en una misma célula hospedadora de dichas poliproteína viral y proteína VP1 de IBDV permite la formación de VLPs completas de IBDV. En otra realización particular, se obtienen unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la poliproteína viral a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende las ORFs correspondientes a la poliproteína de IBDV bajo el control de un promotor de baculovirus y unos baculovirus recombinantes capaces de expresar en células hospedadoras apropiadas la proteína VP1 de IBDV a partir de una secuencia de ácido nucleico que comprende la ORF correspondiente a la VP1 de IBDV bajo el control de un promotor, igual o diferente al que regula la expresión de la poliproteína viral en dichos baculovirus recombinantes capaces de expresar la poliproteína viral. La infección conjunta (co-infección) de células hospedadoras apropiadas, tales como células de insecto, con dichos baculovirus recombinantes capaces de expresar la poliproteína viral y con dichos baculovirus recombinantes capaces de expresar la proteína VP1 de IBDV, permite la expresión simultánea en dichas células co-infectadas de la poliproteína viral y de la proteína VP1 de IBDV, lo que permite la formación de VLPs completas de IBDV. Los baculovirus recombinantes resultantes constituyen un aspecto adicional de la presente invención.

En otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo del sistema de expresión

génica proporcionado por esta invención para la producción de VLPs completas de IBDV de la invención, las cuales constituyen un aspecto adicional de esta invención.

Las VLPs completas de IBDV de la invención pueden ser utilizadas para inmunizar animales, en particular, aves, *per se* o como vectores o vehiculizadores de moléculas con actividad biológica, por ejemplo, polipéptidos, proteínas, ácidos nucleicos, fármacos, etc., por lo que pueden ser utilizadas con fines terapéuticos o de diagnóstico. En una realización particular, dichas moléculas con actividad biológica incluyen antígenos o inductores de respuestas inmune en animales o humanos a los que se suministre, o bien fármacos que se liberan en su sitio de acción específico, o bien secuencias de ácido nucleico, todas ellas útiles en terapia génica y destinadas a ser introducidas en el interior de las células apropiadas.

Por tanto, en otro aspecto, la invención se relaciona con el empleo de las VLPs completas de IBDV de la invención en la elaboración de medicamentos tales como, vacunas, vectores para terapia génica (delivery systems), etc. En una realización particular, dicho medicamento es una vacuna destinada a conferir protección a animales, en particular, aves, frente al virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV). En otra realización particular, dicho medicamento es un vector para terapia génica.

En otro aspecto, la invención proporciona una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de VLPs completas de IBDV de la invención, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables. Dicha vacuna es útil para proteger animales, en particular, aves, frente al virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV). En una realización particular, dichas aves se seleccionan del grupo formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces. En una realización preferida, la vacuna proporcionada por esta invención es una vacuna útil para proteger pollos de la infección causada por IBDV.

En el sentido utilizado en esta descripción, la expresión "cantidad terapéuticamente efectiva" se refiere a la cantidad de VLPs completas de IBDV de la invención calculada para producir el efecto deseado y, en general, vendrá determinada, entre otras causas, por las características propias de las VLPs completas de IBDV de la invención y el efecto de inmunización a conseguir.

Los adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables que pueden ser utilizados en dichas vacunas son los adyuvantes y vehículos conocidos por los técnicos en la materia y utilizados habitualmente en la elaboración de vacunas.

En una realización particular, dicha vacuna se prepara en forma de una solución o

suspensión acuosa, en un diluyente farmacéuticamente aceptable, tal como solución salina, solución salina tamponada con fosfato (PBS), o cualquier otro diluyente farmacéuticamente aceptable.

La vacuna proporcionada por esta invención puede ser administrada por cualquier vía de administración apropiada que dé como resultado una respuesta inmune protectora frente a la secuencia heteróloga o epítipo utilizado, para lo cual dicha vacuna se formulará en la forma farmacéutica adecuada a la vía de administración elegida. En una realización particular, la administración de la vacuna proporcionada por esta invención se efectúa por vía parenteral, por ejemplo, por vía intraperitoneal, subcutánea, etc.

Los siguientes Ejemplos ilustran la invención y no deben ser considerados limitativos del alcance de la misma. El Ejemplo 1 pone de manifiesto que la delección del extremo C-terminal de la proteína VP3 de IBDV impide la formación de VLPs de IBDV, mientras que el Ejemplo 2 describe la generación de un baculovirus recombinante que co-expresa las fases de lectura abierta A1 y B1 del genoma de IBDV y el Ejemplo 3 ilustra la obtención de VLPs completas de IBDV a partir de células H5 infectadas con el baculovirus recombinante FBD/Poly-VP1. Para la puesta en práctica de dichos Ejemplos, se utilizaron los materiales y métodos que se describen a continuación.

MATERIALES Y METODOS

Células y virus. Los virus recombinantes VT7/VP3, VT7/Poly Δ 907-1012, FB/Poly, FB/his-VP3 (wt), FB/his-VP3 Δ 253-257, FB/his-VP3 Δ 1-25, FB/his-VP3 Δ 26-52, FB/his-VP3 Δ 53-77, FB/his-VP3 Δ 78-100, FB/his-VP3 Δ 101-124, FB/his-VP3 Δ 125-150, FB/his-VP3 Δ 151-175, FB/his-VP3 Δ 176-200, FB/his-VP3 Δ 201-224 y FB/his-VP3 Δ 216-257 fueron descritos previamente (Fernández-Arias A et al. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol. 71:8014-8; Kadono-Okuda K et al. 1995. Baculovirus-mediated production of the human growth hormone in larvae of the silkworm, Bombyx mori. Biochem Biophys Res Commun. 213:389-96; Kochan G et al. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. 2003. Archives of Virology 148:723-744; Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. Virology. 278:322-31).

Los experimentos de expresión fueron llevados a cabo con células BSC-1 (American Type Culture Collection, ATCC; Catálogo CCL26), H5 [HighFiveTM (GIBCO)] y Sf9

(GIBCO). Las células BSC-1 fueron cultivadas en medio de Dulbecco modificado por Eagle suplementado con suero fetal bovino al 10%. Las células H5 y Sf9 fueron cultivadas en medio TC-100 (GIBCO) suplementado con suero fetal bovino al 10%. Los virus fueron amplificados y titulados siguiendo protocolos previamente descritos (Lombardo E et al. 2000. VP5, the nonstructural polypeptide of infectious bursal disease virus, accumulates within the host plasma membrane and induces cell lysis. *Virology*. 277:345-57; Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology*. 278:322-31).

El aislado de IBDV utilizado fue IBDV cepa Soroa.

10

Generación de baculovirus recombinantes. El plásmido pFB/his-VP3, previamente descrito, fue utilizado como molde en la generación, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), de los fragmentos de ADN empleados en la construcción de los vectores plasmídicos necesarios para la construcción de los baculovirus recombinantes FB/his-VP3 Δ 248-257, FB/his-VP3 Δ 243-257, FB/his-VP3 Δ 238-257, FB/his-VP3 Δ 233-257, y FB/his-VP3 Δ 228-257. Las reacciones de PCR fueron realizadas empleando un iniciador 5' común (SEQ. ID. NO: 4) y un iniciador 3' específico para cada mutante (Tabla 1).

15

Tabla 1

Generación de mutantes de delección del extremo carboxi terminal de His-VP3

20

Mutante	Secuencia
His-VP3 Δ 248-257	SEQ. ID. NO: 5
His-VP3 Δ 243-257	SEQ. ID. NO: 6
His-VP3 Δ 238-257	SEQ. ID. NO: 7
His-VP3 Δ 233-257	SEQ. ID. NO: 8
His-VP3 Δ 228-257	SEQ. ID. NO: 9

25

Tras las reacciones de PCR, los fragmentos de ADN correspondientes fueron purificados y digeridos con los enzimas de restricción *ApaI* y *KpnI* y ligados al plásmido pFB/his-VP3 (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. *Archives of Virology* 148:723-744) previamente digerido con los mismos enzimas. De esta manera se generó la serie de plásmidos denominados genéricamente pFB/his- Δ VP3 (pFB/his-VP3 Δ n-n' de forma más específica, donde n y n' indican los límites de la región delecionada) que contienen deleciones en el extremo 5' de la región codificante de VP3.

La construcción de los vectores plasmídicos requeridos para la generación de los baculovirus recombinantes FB/Poly Δ 1008-1012, FB/Poly Δ 1003-1012 y FB/Poly Δ 998-1012 fue realizada mediante la substitución del fragmento *Xba* I (343 pares de bases) por sus homólogos, conteniendo las delecciones deseadas, procedentes de los plásmidos FB/his-VP3 Δ 233-257, FB/his-VP3 Δ 248-257, y FB/his-VP3 Δ 243-257, respectivamente.

La construcción del vector plasmídico pFB/VP1 se realizó mediante clonaje de un fragmento de ADN, que contiene la fase de lectura abierta del gen de la proteína VP1 de IBDV, a partir del plásmido pBSKVP1 (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83) mediante digestión del plásmido con el enzima de restricción *Cla*I seguido por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posterior tratamiento con el enzima *Not*I. Este fragmento fue subclonado en el vector pFastBac1 (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas de restricción *Stu*I y *Not*I. El plásmido resultante se denominó pFB/VP1.

Los vectores plasmídicos pFBD/his-VP3-VP1 y pFBD/Poly-VP1 fueron construidos mediante la inserción de las fases de lectura abierta de los genes de las proteínas VP3 y VP1 en el vector pFastBacDual (Invitrogen). pFBD/VP1 fue generado mediante inserción de un fragmento que contiene la fase de lectura abierta de VP1 obtenido mediante digestión con el enzima *Not*I, seguido por tratamiento con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa I y posterior tratamiento con el enzima *Xho*I, en el vector pFastBacDual (Invitrogen) previamente digerido con los enzimas *Xho*I y *Pvu*II. A continuación, el plásmido pFB/his-VP3 (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. Archives of Virology 148:723-744) fue digerido con los enzimas *Not*I y *Rsr*II, y el fragmento resultante conteniendo la fase de lectura abierta his-VP3 fue insertado en el plásmido pFBD/VP1 previamente digerido con los enzimas *Not*I y *Rsr*II. El plásmido resultante se denominó pFBD/his-VP3-VP1. De forma similar, la fase de lectura abierta correspondiente a la poliproteína de IBDV fue aislada a partir del plásmido pCIneoPoly (Maraver A et al. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus. J. Virol. 77:2459-2468) mediante digestión con los enzimas *Eco*RI y *Not*I. El fragmento de ADN correspondiente fue clonado en el plásmido pFBD/VP1 previamente digerido con los enzimas *Eco*RI y *Not*I, dando lugar al vector denominado pFBD/Poly-VP1.

Los baculovirus recombinantes descritos anteriormente fueron generados usando el sistema Bac-to-Bac siguiendo los protocolos descritos por el fabricante (Invitrogen).

Purificación mediante gradientes de sacarosa y caracterización de las
5 **estructuras derivadas de la expresión de la poliproteína de IBDV.** Células BSC-1 o H5 fueron infectadas con los virus vacunales o baculovirus recombinantes descritos. Las células infectadas fueron recogidas, lisadas y procesadas como se ha descrito anteriormente (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient
10 encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83; Castón JR et al. 2001. C terminus of infectious bursal disease virus major capsid protein VP2 is involved in definition of the the number for capsid assembly. J. Virol. 75:10815-28).

Microscopía electrónica. Alicuotas de 5 µl de las diferentes fracciones de los
15 gradientes de sacarosa analizados se colocaron sobre rejillas de microscopía electrónica. Las muestras así preparadas fueron teñidas negativamente con una solución al 2% de acetato de uranilo. Las micrografías fueron obtenidas con un microscopio Jeol 1200 EXII operando a 100 kV con magnificaciones de 20.000 ó 40.000 X.

Purificación de proteínas de fusión his-VP3 y derivados mediante cromatografía
20 **de afinidad a metales (IMAC).** Células H5 o Sf9 infectadas con los diferentes virus recombinantes descritos fueron recogidas a las 72 h.p.i. Después de lavar dos veces en tampón fostato salino (PBS) las células fueron resuspendidas en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM, pH 8,0; NaCl 500 mM) suplementado con inhibidores de proteasas (Complete Mini,
25 Roche) y mantenidas en hielo durante 20 minutos. A continuación, las muestras fueron sometidas a centrifugación a 13.000 x g durante 10 minutos a 4°C. Los sobrenadantes correspondientes fueron sometidos a purificación mediante IMAC utilizando una resina unida a cobalto (Talon, Clontech Laboratories, Inc., Palo Alto, CA) siguiendo las instrucciones del fabricante.

30

Electroforesis y Western blot. Las muestras de proteína fueron resuspendidas en tampón de Laemmli (King J & Laemmli UK. 1973. Bacteriophage T4 tail assembly: structural proteins and their genetic identification. J Mol Biol. 1973 Apr 5;75(2):315-37) y

sometidas a calentamiento a 100°C durante 5 minutos. Las electroforesis fueron realizadas en geles al 11% de poliacrilamida. A continuación, las proteínas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa mediante *electroblotting*. Antes de la incubación con antisueros específicos las membranas fueron bloqueadas mediante incubación, durante 1 h a temperatura ambiente, con leche en polvo al 5% diluida en PBS.

Inmunofluorescencia (IF) y microscopía confocal (CLSM). Células BSC-1 o H5 fueron crecidas sobre cubres e infectadas con los recombinantes de virus vacunal o baculovirus. A los tiempos post-infección indicados las células fueron lavadas dos veces con PBS y fijadas con metanol a -20°C durante 10 minutos. Tras la fijación, los cubres fueron secados al aire, bloqueados en una solución de suero de ternera recién nacida al 20% en PBS durante 45 minutos a temperatura ambiente, e incubados con los antisueros indicados. Las muestras fueron visualizadas mediante epifluorescencia empleando un microscopio Zeiss Axiovert 200 equipado con un sistema confocal Bio-Rad Radiance 2100. Las imágenes fueron obtenidas empleando los programas Laser Sharp software package (Bio-Rad).

Análisis mediante espectrometría de masas (MS). Las proteínas fueron pasadas a través de minicolumnas C-18 ZipTip tips (Millipore, Bedford, MA, USA) y eluidas en solución matriz (ácido 3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico saturado en solución acuosa de 33% acetonitrilo y 0,1% de ácido trifluoroacético). Una alícuota de 0,7 µl de la mezcla resultante fue depositada en una sonda MALDI de acero que fue posteriormente secada al aire. Las muestras fueron analizadas empleando un espectrómetro de masas Bruker Reflex™ IV MALDI-TOF (Bruker-Franzen Analytic GmbH, Bremen, Alemania) equipado con una fuente SCOUT™ reflector en modo reflector ión positivo empleando extracción retardada. El voltaje de aceleración fue de 20 kV. El equipo fue calibrado externamente empleando señales de masa correspondientes a BSA y dímeros de BSA que cubre el rango de 20-130 m/z.

EJEMPLO 1

La delección del extremo C-terminal de la proteína VP3 elimina la formación de VLPs de IBDV

Recientemente se ha descrito que el extremo C-terminal de VP3 contiene el dominio responsable de la interacción de esa proteína con la proteína VP1 (Maraver A et al.

Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of the inner capsid protein VP3 of infectious bursal disease virus). Por ello, se decidió analizar el posible papel de la región C-terminal de VP3 en la morfogénesis de las VLPs de IBDV. Como punto de partida para este análisis se empleó el virus vacunal recombinante denominado VT7/PolyΔ907-1012 que expresa una forma delecionada de VP3 que carece de los 105 residuos del extremo C-terminal (Sánchez Martínez AB. 2000. Caracterización de las modificaciones co y post-traduccionales de la poliproteína del virus de la bursitis infecciosa. Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Madrid. Facultad de Ciencias Biológicas) (Figura 1A). El análisis mediante SDS-PAGE y Western blot mostró que la deleción no afecta al procesamiento proteolítico co-traduccional de la poliproteína (Sánchez Martínez AB. 2000. Tesis doctoral citada *supra*). La expresión de la proteína PolyΔ907-1012 da lugar a la formación de estructuras tubulares similares a los túbulos de tipo I formados en células infectadas con IBDV (Kaufér, I., and E. Weiss 1976. Electron-microscope studies on the pathogenesis of infectious bursal disease after intrabursal application of the causal virus. Avian Dis. 20:483-95). Las estructuras tubulares formadas por expresión de PolyΔ907-1012 se detectaron mediante inmunofluorescencia empleando anticuerpos anti-VPX/2 (anti-pVP2/VP2) y anti-VP3 (Figura 1B), y mediante microscopía electrónica de fracciones obtenidas mediante purificación en gradientes de sacarosa (Figura 1C). El análisis mediante Western blot confirmó la presencia de VPX y VP3 en los citados túbulos.

Con el fin de confirmar que el fenotipo mencionado era debido a la deleción dentro de la región correspondiente a VP3, se realizó un experimento co-infectando células BSC-1 con VT7/PolyΔ907-1012 y VT7/VP3. VT7/VP3 es un recombinante de virus vacunal que expresa la proteína VP3 completa (Fernández-Arias A et al. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. J Virol. 71:8014-8). Un análisis realizado mediante microscopía confocal demostró que la co-expresión de la proteína VP3 completa produce una reducción significativa en la formación de túbulos de tipo I. En las células coinfectadas, la distribución subcelular de las proteínas VPX/VP3 se caracteriza por la formación de túbulos cortos y viroplasmas similares a los detectados en células infectadas con la poliproteína completa (Figura 1B). Esta observación indica que la co-expresión de la proteína VP3 completa rescata parcialmente la capacidad de la proteína PolyΔ907-1012 de formar VLPs. El análisis mediante microscopía electrónica de fracciones derivadas de la co-infección confirmó esta hipótesis. Así, las fracciones superiores del gradiente estaban muy enriquecidas en túbulos cortos y ensamblados quasi-esféricos,

denominados capsoides, con un diámetro de 60-70 nm, junto con una pequeña proporción de VLPs de contorno poligonal (Figura 1C). El análisis mediante Western blot de las fracciones superiores del gradiente, que contenían la mayor concentración de capsoides, puso de manifiesto que contenían una mayor proporción de proteína VP3 completa que de proteína VP3 Δ 907-1012 (datos no mostrados). Este resultado indicó que la incorporación de la proteína VP3 completa en estas estructuras es más eficiente que la de la forma delecionada. Estos resultados demuestran que el extremo C-terminal de VP3 juega un papel fundamental en la morfogénesis de la cápsida de IBDV.

La proteína VP3 sufre un procesamiento proteolítico en células de insecto. Se ha descrito anteriormente que la expresión de la poliproteína de IBDV en células de insecto produce el ensamblado de túbulos largos formados por hexámeros de trímeros de VPX (Da Costa, B., C. Chevalier, C. Henry, J. C. Huet, S. Petit, J. Lepault, H. Boot, and B. Delmas 2002. The capsid of infectious bursal disease virus contains several small peptides arising from the maturation process of pVP2. *J Virol.* 76:2393-402; Martínez-Torrecuadrada JL et al. 2000. Different architectures in the assembly of infectious bursal disease virus capsid proteins expressed in insect cells. *Virology.* 278:322-31). La similitud entre los túbulos observados en células de mamífero infectadas con VT7/Poly Δ 907-1012 y los detectados en células de insecto infectadas con baculovirus recombinantes que expresan la poliproteína completa llevó a analizar el estado de la proteína VP3 acumulada en células de insecto. Para ello, extractos de células infectadas con IBDV, VT7/Poly (Fernández-Arias A et al. 1998. Expression of ORF A1 of infectious bursal disease virus results in the formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.* 79: 1047-54) y FB/Poly, respectivamente, fueron analizados mediante Western blot usando suero anti-VP3 (Fernández-Arias A et al. 1997. The major antigenic protein of infectious bursal disease virus, VP2, is an apoptotic inducer. *J Virol.* 71:8014-8). En células infectadas con IBDV y VT7/Poly, se detectó mediante Western blot la presencia de una única banda de 29 kDa, el tamaño esperado de la proteína VP3 completa (Figura 2). Por el contrario, en células de insecto infectadas con FB/Poly se detectó mediante Western blot la presencia de dos bandas correspondientes a polipéptidos de 29 y 27 kDa, respectivamente (Figura 2). Un análisis de la expresión temporal demostró que aunque la aparición del producto de 27 kDa está ligeramente retrasada con respecto a la aparición del producto de 29 kDa, pasa a ser predominante durante la fase tardía de la infección (Figura 8A). Un análisis similar realizado en células Sf9 produjo idénticos resultados (datos no mostrados). Estos resultados demuestran que en células de insecto la proteína VP3 sufre una

modificación post-traducciona que da lugar a la acumulaci3n de un producto de 27 kDa.

La infecci3n de c3lulas de insecto con un baculovirus recombinante, FB/his-VP3, que expresa una versi3n de VP3 que contiene una cola de seis residuos de histidina (6xhis), denominada his-VP3 (Figura 3A), da lugar a la acumulaci3n de dos f3rmas moleculares de la prote3na de 32 y 30 kDa, respectivamente, similares a las observadas en c3lulas infectadas con FB/Poly (Kochan G et al. 2003. Characterization of the RNA binding activity of VP3, a major structural protein of IBDV. Archives of Virology 148:723-744). Por ello, se utiliz3 FB/his-VP3 como herramienta para determinar el origen de la prote3na VP3 de menor tama1o. Para ello, tanto extractos totales de c3lulas infectadas con FB/his-VP3 como prote3na purificada mediante IMAC fueron analizados mediante SDS-PAGE y Western blot empleando suero anti-VP3 (Figura 3B) y anti-6xhis (Figura 3C). Como se muestra en la Figura 3B, el polip3ptido de 30 kDa se encuentra presente en la muestra de prote3na purificada lo que demuestra que su extremo N-terminal permanece intacto. Por otra parte, tanto el producto de 32 kDa como el de 30 kDa son reconocidos por ambos antisuecos (Figuras 3B y 3C). Estos resultados indican muy fuertemente que en c3lulas de insecto la prote3na VP3 sufre una proteolisis que da lugar a la acumulaci3n de un producto que carece de un fragmento de 2 kDa en su extremo C-terminal. Con el fin de determinar firmemente esta posibilidad se emplearon seis baculovirus recombinantes denominados his-VP3 Δ 253-257, his-VP3 Δ 248-257, his-VP3 Δ 243-257, his-VP3 Δ 238-257, his-VP3 Δ 233-257 e his-VP3 Δ 228-257, respectivamente (Figura 4A) [corresponden a los definidos en el apartado de Materiales y M3todos, sub-apartado C3lulas y Virus, con igual nomenclatura pero precedidos por "FB/" (indicativo del nombre del pl3smido empleado para generar los virus (pFastBac1))]. Estos baculovirus recombinantes expresan una serie de formas de delec3n de VP3 que contienen una cola de histidinas. Las deleciones fueron generadas para eliminar de forma escalonada grupos de 5 residuos aminoac3dicos y, as3, generar una colecci3n con deleciones crecientes en el extremo C-terminal de la prote3na VP3 tal como se muestra en la Figura 4A. La expresi3n de estas prote3nas fue analizada mediante Western blot empleando suero anti-VP3. Como se muestra en la Figura 4B, la expresi3n de la prote3na completa his-VP3 (his-VP3 wt) y de la prote3na mutante his-VP3 Δ 253-257 dio lugar a la formaci3n de dobletes. Por otro lado, las prote3nas que conten3an deleciones de 10 o m3s residuos migraron de acuerdo con su tama1o esperado dando lugar a una sola banda (Figura 4B). Este resultado demuestra que el extremo C-terminal de la prote3na VP3 es procesado proteol3ticamente y que la delec3n del sitio de corte evita la proteolisis. La movilidad

electroforética de la proteína his-VP3Δ248-257 es ligeramente inferior a la de los polipéptidos generados por procesamiento proteolítico de his-VP3 e his-VP3Δ253-257, lo que indica que el procesamiento tiene lugar en la región localizada entre los residuos 243 y 248. Probablemente, el extremo C-terminal de la proteína his-VP3Δ248-257 es demasiado corto como para permitir el reconocimiento por parte de la proteasa, y, por ello, no sufriría el procesamiento proteolítico.

Con el fin de confirmar los resultados obtenidos con los mutantes de delección de his-VP3 y establecer de una forma precisa la posición de sitio de corte proteolítico en la proteína VP3, extractos de células H5 infectadas con FB/his-VP3 fueron sometidos a purificación mediante IMAC. La proteína purificada resultante fue analizada mediante espectrometría de masas. El experimento fue repetido tres veces empleando purificaciones independientes. Los resultados obtenidos fueron similares en todos los casos (una diferencia en masa inferior al 0,03%). La Figura 5A muestra los resultados de uno de estos experimentos. Se determinó la presencia de dos polipéptidos de 32.004 y 30.444 Da, respectivamente. Estos resultados muestran que el procesamiento proteolítico produce la eliminación de un péptido de 1.560 Da del extremo C-terminal de his-VP3. Este tamaño encaja con la masa molecular (1.576 Da) correspondiente a los 13 residuos C-terminales de VP3 (SEQ. ID. NO: 3) (Figura 5B).

El conjunto de estos resultados demuestra que la proteína VP3 es procesada proteolíticamente en células de insecto entre los residuos L244 y G245, dando lugar a un polipéptido que carece de los 13 residuos C-terminales.

EJEMPLO 2

Generación de un baculovirus recombinante que co-expresa las fases de lectura abierta A1 y B1 del genoma de IBDV

2.1 Construcción del plásmido pFBD/VP1

La secuencia nucleotídica correspondiente a la fase de lectura abierta B1 del genoma de IBDV se obtuvo a partir del plásmido pBSKVP1 descrito anteriormente (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83). El plásmido fue purificado y sometido a los siguientes tratamientos enzimáticos: i) digestión con el enzima de restricción *NotI*; ii) incubación con el fragmento Klenow de la ADN polimerasa de *E. coli* en presencia de dNTPs; y iii) digestión con el enzima de restricción *XhoI*. A continuación, el fragmento de

ADN correspondiente fue purificado y utilizado para su clonaje en el vector pFastBacDual (Invitrogen) previamente tratado con los enzimas de restricción *Xho*I y *Pvu*II. Para ello, el fragmento de ADN y el plásmido linearizado fueron incubados en presencia de la ADN ligasa de T4 para generar el plásmido pFBD/VP1.

5

2.2 Construcción del plásmido pFBD/Poly-VP1

La secuencia nucleotídica correspondiente a la fase de lectura abierta A1 del genoma de IBDV se obtuvo a partir del plásmido pCIneoPoly descrito anteriormente (Lombardo E et al. 1999. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. J. Virol. 73:6973-83). El plásmido fue purificado e incubado con los enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I. El fragmento de ADN correspondiente fue purificado e incubado con el plásmido pFBD/VP1, previamente digerido con los enzimas de restricción *Eco*RI y *Not*I, en presencia de la ADN ligasa de T4 para generar el plásmido pFBD/Poly-VP1. Un cultivo de bacterias transformadas con dicho plásmido pFBD/Poly-VP1 ha sido depositado en la CECT con el número de depósito CECT 5777.

10

15

2.3 Obtención del bácmido Bac/pFBD/Poly-VP1

Se realizó mediante transformación de bacterias competentes DH10Bac (Invitrogen), selección de colonias positivas en medio selectivo y purificación siguiendo la metodología descrita por Invitrogen (números de catálogo 10359016 y 10608016).

20

2.4 Obtención del baculovirus recombinante FBD/Poly-VP1

El virus fue obtenido mediante transfección de células H5 (Invitrogen) con el bácmido Bac/pFBD/Poly-VP1 previamente purificado siguiendo la metodología descrita por Invitrogen (números de catálogo 10359016 y 10608016).

25

EJEMPLO 3

Obtención de VLPs completas de IBDV a partir de células H5 infectadas con el baculovirus recombinante FBD/Poly-VP1

30

Cultivos de células H5 fueron infectadas con el virus recombinante FBD/Poly-VP1 (Ejemplo 2) empleando una multiplicidad de infección de 5 unidades formadoras de placas por célula. Los cultivos fueron recogidos a las 72 horas post-infección (h.p.i). Las células

fueron sedimentadas mediante centrifugación (1.500 x g durante 10 minutos). El sedimento celular fue resuspendido en tampón PES (PIPES (ácido 1,4-piperazidin etanosulfónico) 25 mM, pH 6,2, NaCl 150 mM, CaCl₂ 20 mM). A continuación, las células fueron homogeneizadas mediante tres ciclos consecutivos de congelación/descongelación (-70°C/+37°C). El homogenado correspondiente fue centrifugado (10.000 x g durante 15 minutos a 4°C). El sobrenadante resultante fue recogido y utilizado para la purificación de las VLPs. Para ello, se preparó un tubo de centrífuga con un colchón de sacarosa al 25% (peso/volumen), diluida en tampón PES, de 4 ml, sobre el que se depositaron 8 ml de sobrenadante. El tubo fue centrifugado (125.000 x g durante 3 h a 4°C). El sedimento resultante se resuspendió en 1 ml de tampón PES. A continuación se preparó, en un tubo de centrífuga, un gradiente continuo de 25-50% de sacarosa en tampón PES, sobre el que se depositó el sedimento resuspendido. El tubo fue centrifugado (125.000 x g durante 1 h a 4°C). A continuación, el gradiente fue fraccionado en alícuotas de 1 ml.

Las diferentes alícuotas fueron analizadas mediante microscopía electrónica de transmisión. Para ello se depositó un volumen de 5 µl de cada muestra sobre una rejilla de microscopio. Las muestras fueron teñidas negativamente con una solución acuosa de acetato de uranilo al 2%. Se empleó un microscopio Jeol 1200 EXII operando a 100 kV y a una magnificación nominal de 40.000 X. Este análisis demostró la presencia de VLPs completas estructuralmente idénticas a los viriones de IBDV en las muestras analizadas.

Con el fin de determinar la composición proteica de las VLPs detectadas mediante microscopía electrónica, las muestras fueron analizadas mediante Western blot. Para ello las muestras fueron sometidas a electroforesis en geles de poliacrilamida. Los geles fueron posteriormente transferidos a nitrocelulosa e incubados con anticuerpos anti-VPX/2 (anti-pVP2/VP2), anti-VP3 y anti-VP1. Los resultados demostraron la presencia de las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 en las fracciones que contenían VLPs.

DEPÓSITO DE MICROORGANISMOS

Un cultivo de la bacteria derivada de DH5, portadora de un plásmido que contiene la construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV (pFBD/Poly-VP1), DH5-pFBD/poly-VP1, ha sido depositado en la Colección Española de Cultivos Tipo (CECT), Universidad de Valencia, Edificio de Investigación, Campus de Burjasot, 46100 Burjasot, Valencia, España, el 8 de marzo de 2003, correspondiéndole el número de depósito CECT 5777.

REIVINDICACIONES

1. Una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho segundo promotor.

10

2. Construcción génica según la reivindicación 1, en la que dicho primer promotor es un promotor viral y dicho segundo promotor es un promotor viral diferente a dicho primer promotor.

15

3. Construcción génica según la reivindicación 1 ó 2, que comprende:

(i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y

20

(ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de un baculovirus,

25

en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

30

4. Construcción génica según la reivindicación 3, en la que dicho primer promotor de baculovirus se selecciona entre el promotor de la proteína p10 del baculovirus *Autographa californica* nucleopolyhedrovirus (AcMNV) y el promotor de la polihedrina del baculovirus AcMNPV.

5. Construcción génica según la reivindicación 3, en la que dicho segundo promotor de baculovirus se selecciona entre el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y el promotor de la polihedrina de AcMNPV.

5

6. Construcción génica según la reivindicación 3, en la que dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV; o en la que dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNPV.

10

7. Construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que comprende la secuencia de nucleótidos identificada como SEQ. ID. NO: 1.

15

8. Un sistema de expresión seleccionado entre:

a) un sistema de expresión que comprende una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción; y

20

b) un sistema de expresión que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha primera construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha segunda construcción génica comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor.

25

30

9. Sistema de expresión según la reivindicación 8, que comprende una construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicha construcción génica comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

10

10. Sistema de expresión según la reivindicación 8, que comprende (1) una primera construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha primera construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, y (2) una segunda construcción génica, operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, comprendiendo dicha segunda construcción génica una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus.

25

11. Sistema de expresión según la reivindicación 10, en el que dicho primer promotor de baculovirus y dicho segundo promotor de baculovirus son iguales o diferentes entre sí.

30

12. Sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 11, seleccionado entre plásmidos, bácmidos, cromosomas artificiales de levadura (YACs), cromosomas artificiales de bacteria (BACs), cromosomas artificiales basados en el bacteriófago P1 (PACs), cósmidos y virus, que pueden contener, opcionalmente, un origen de replicación heterólogo.

13. Una célula hospedadora que contiene una construcción génica según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, o un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

5 14. Una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12.

15 15. Célula según cualquiera de las reivindicaciones 13 ó 14, seleccionada entre bacterias y células animales.

10

16. Célula según la reivindicación 15, caracterizada porque es la bacteria identificada como DH5-pFBD/Poly-VP1 depositada en la CECT con el número de depósito CECT 5777.

15 17. Célula según la reivindicación 15, seleccionada entre células de insecto, células aviares y células de mamífero.

18. Un baculovirus recombinante dual que expresa simultáneamente la poliproteína de IBDV y la proteína VP1 de IBDV a partir de (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV
20 operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, y de (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus.

25

19. Empleo de un sistema de expresión según cualquiera de las reivindicaciones 8 a 12, o de un baculovirus recombinante dual según la reivindicación 17, para la producción de cápsidas virales vacías completas de IBDV.

30 20. Un procedimiento para la producción de cápsidas virales vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV] que comprende cultivar una célula hospedadora según cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, y, si se desea, recuperar dichas VLPs completas de IBDV.

21. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que
5 comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a dicha poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que
10 comprende un segundo promotor, en donde dicho primer promotor es distinto a dicho primer promotor.

22. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula transformada, transfectada o infectada con un sistema de expresión que comprende una construcción génica que comprende (1) una primera construcción génica que
15 comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a dicha poliproteína de IBDV y (2) una segunda construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a dicha proteína VP1 de IBDV, estando cada una de dichas secuencias de
20 nucleótidos que comprenden las ORFS correspondientes a la poliproteína viral y a la proteína VP1 de IBDV bajo el control de sendas secuencias de nucleótidos que comprenden sendos promotores, iguales o diferentes entre sí.

23. Procedimiento según cualquiera de las reivindicaciones 21 ó 22, en el que dicha célula hospedadora es una célula de insecto.

25

24. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula de insecto, que comprende las etapas de:

a) preparar un sistema de expresión constituido por un baculovirus recombinante
30 dual que comprende una construcción génica que comprende (i) una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de baculovirus, estando dicha construcción

- génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un segundo promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, en donde dicho promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus;
- 5
- 10 b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y
- 15
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.
25. Procedimiento según la reivindicación 20, en el que dicha célula hospedadora es una célula de insecto, que comprende las etapas de:
- 20
- a) preparar un sistema de expresión constituido por (1) un primer baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a un promotor de baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción, y por (2) un segundo baculovirus recombinante que comprende una construcción génica que comprende una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a un promotor de un baculovirus, estando dicha construcción génica operativamente unida a unos elementos de control de transcripción y, opcionalmente, de traducción;
- 25
- 30

- b) infectar células de insecto con dicho sistema de expresión preparado en la etapa a);
- 5 c) cultivar las células de insecto infectadas obtenidas en la etapa b) bajo condiciones que permiten la expresión de las proteínas recombinantes y su ensamblaje para formar VLPs completas de IBDV; y
- d) si se desea, aislar y, opcionalmente, purificar, dichas VLPs completas de IBDV.
- 10 26. Cápsidas vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV], obtenidas según el procedimiento de cualquiera de las reivindicaciones 20 a 25.
- 15 27. Cápsidas vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV], caracterizadas porque contienen las proteínas VPX, VP2, VP3 y VP1 de IBDV.
- 20 28. Empleo de cápsidas vacías completas del virus inductor de la enfermedad de la bursitis infecciosa (IBDV) [VLPs completas de IBDV], según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, en la elaboración de un medicamento.
- 25 29. Empleo según la reivindicación 28, en el que dicho medicamento es una vacuna frente a la enfermedad aviar denominada bursitis infecciosa.
- 30 30. Empleo según la reivindicación 28, en el que dicho medicamento es un vector para terapia génica.
31. Una vacuna que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías completas de IBDV [VLPs completas de IBDV], según cualquiera de las reivindicaciones 26 ó 27, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

32. Vacuna según la reivindicación 31, para proteger aves de la infección causada por IBDV.

33. Vacuna según la reivindicación 32, en la que dichas aves se seleccionan del grupo
5 formado por pollos, pavos, ocas, gansos, faisanes, codornices y avestruces.

34. Una vacuna para proteger pollos de la infección causada por el virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) que comprende una cantidad terapéuticamente efectiva de cápsidas vacías completas de IBDV, VLPs completas de IBDV, según cualquiera de las
10 reivindicaciones 26 ó 27, junto con, opcionalmente, uno o más adyuvantes y/o vehículos farmacéuticamente aceptables.

35. Un procedimiento para la obtención de un baculovirus recombinante dual que permite la expresión simultánea en células de insecto de la poliproteína del virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV) y de la proteína VP1 de IBDV a partir de dos fases de lectura
15 abiertas independientes y controladas, cada una de ellas, por un promotor de baculovirus diferente, que comprende:

a) construir un plásmido portador de una construcción génica que contiene (i) una
20 secuencia de nucleótidos que comprende las fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que comprende un primer promotor de un baculovirus, y (ii) una secuencia de nucleótidos que comprende la fase de lectura abierta correspondiente a la proteína VP1 de IBDV operativamente unida a una secuencia de nucleótidos que
25 comprende un segundo promotor de un baculovirus, en donde dicho primer promotor de baculovirus es distinto a dicho segundo promotor de baculovirus;

b) obtener un bácmido recombinante, que permite la expresión de forma simultánea durante su ciclo replicativo de la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el
30 control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante la transformación de bacterias competentes con el plásmido obtenido en a); y

c) obtener un baculovirus recombinante dual, que permite la expresión simultánea de las

fases de lectura abiertas correspondientes a la poliproteína y la proteína VP1 de IBDV bajo el control transcripcional de dichos promotores de baculovirus, mediante transformación de células de insecto con el bácmido recombinante de b).

5 36. Procedimiento según la reivindicación 35, en el que:

- dicho primer promotor de baculovirus es el promotor de la proteína p10 de AcMNV y dicho segundo promotor de baculovirus es el promotor de la polihedrina de AcMNPV, o viceversa;

10

- el plásmido obtenido en a) es el identificado como pFBD/Poly-VP1;

- las bacterias competentes de b) son *E. coli* DH10Bac;

15

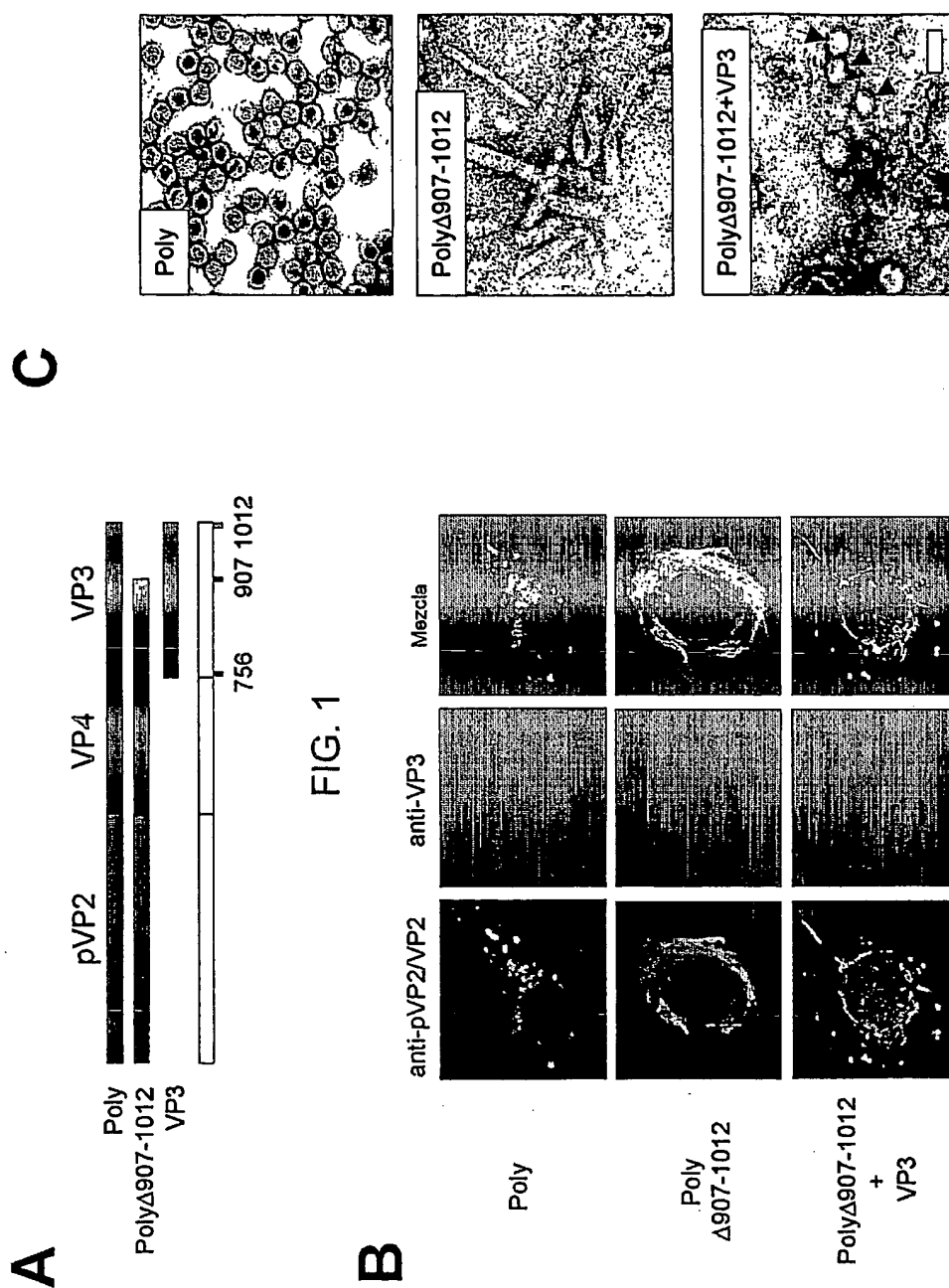
- el bácmido recombinante obtenido en b) es el identificado como Bac/pFBD/Poly-VP1; y

- el baculovirus recombinante obtenido es el identificado como FBD/Poly-VP1.

20

37. Procedimiento según la reivindicación 35 ó 36, que comprende, además, la infección de células de insecto con el baculovirus recombinante dual obtenido en la etapa c).

38. Procedimiento según la reivindicación 37, en el que dichas células de insecto son células H5 o de *Spodoptera frugiperda* Sf9.



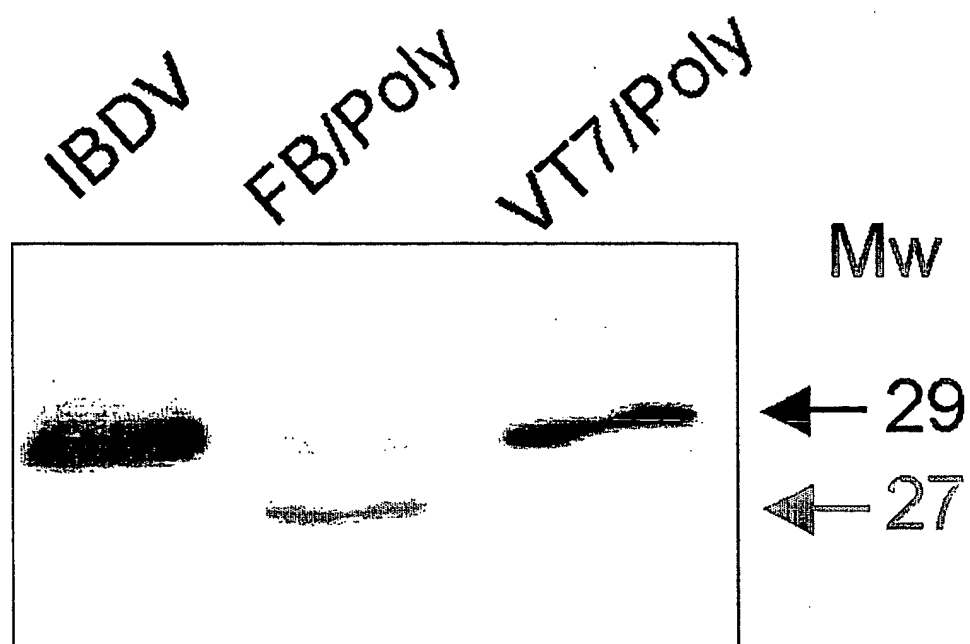


FIG. 2

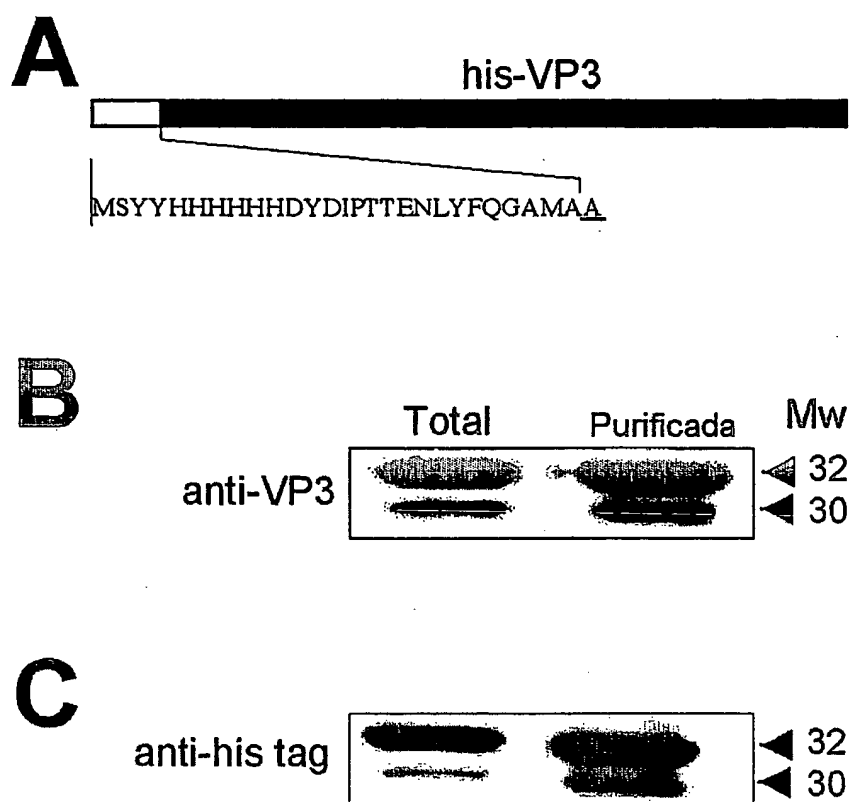


FIG. 3

A

		222	257
his-VP3 wt	his-VP3	PRRALPKPKPKPNAPTQRPPGRLGRWIRTVSDEDLE	
his-VP3 Δ 253-257	his-VP3	PRRALPKPKPKPNAPTQRPPGRLGRWIRTVS	
his-VP3 Δ 248-257	his-VP3	PRRALPKPKPKPNAPTQRPPGRLGRW	
his-VP3 Δ 243-257	his-VP3	PRRALPKPKPKPNAPTQRPPG	
his-VP3 Δ 238-257	his-VP3	PRRALPKPKPKPNAPT	
his-VP3 Δ 233-257	his-VP3	PRRALPKPKPK	
his-VP3 Δ 228-257	his-VP3	PRRALP	

B

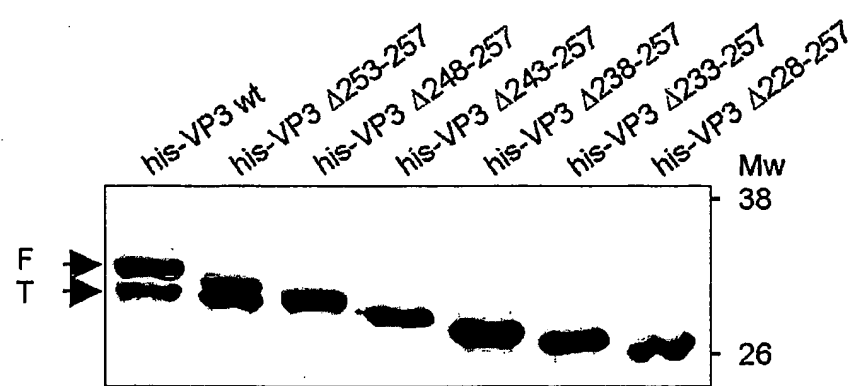


FIG. 4

5/9

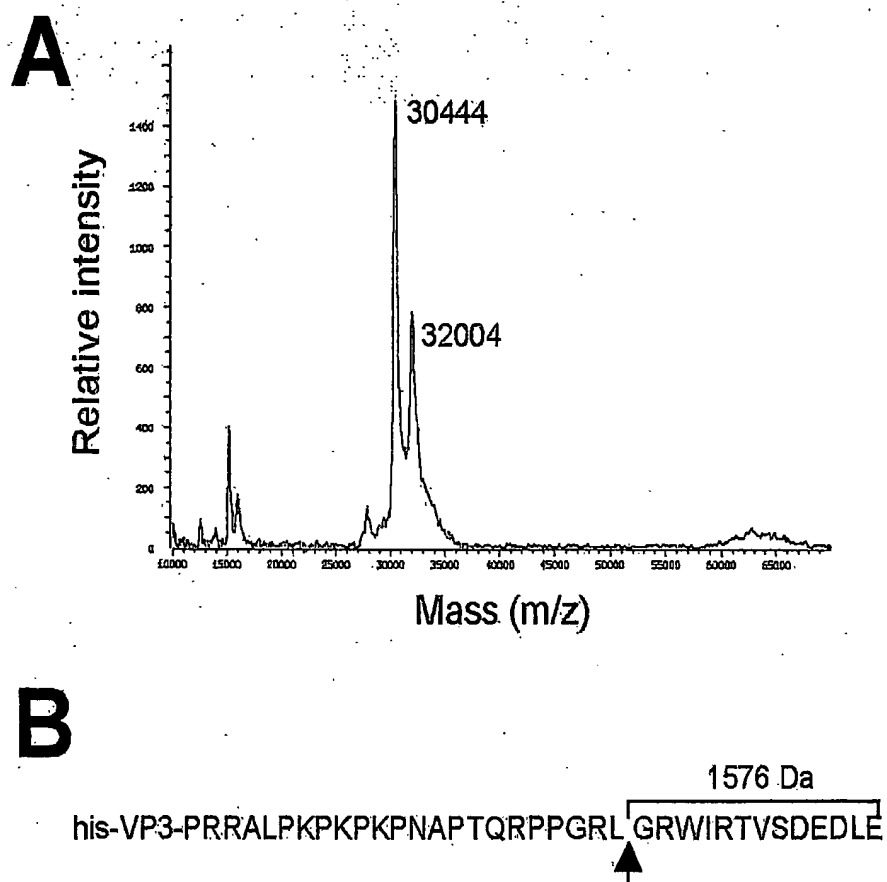
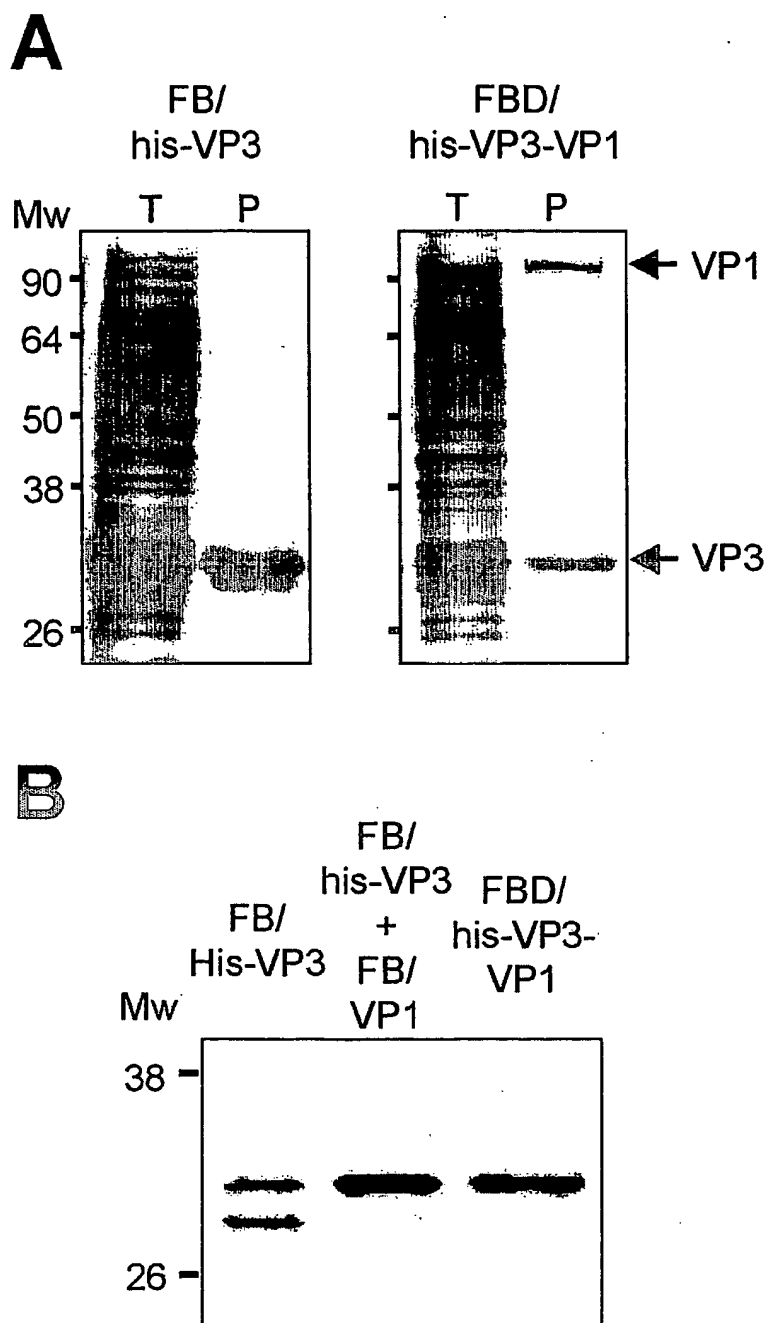
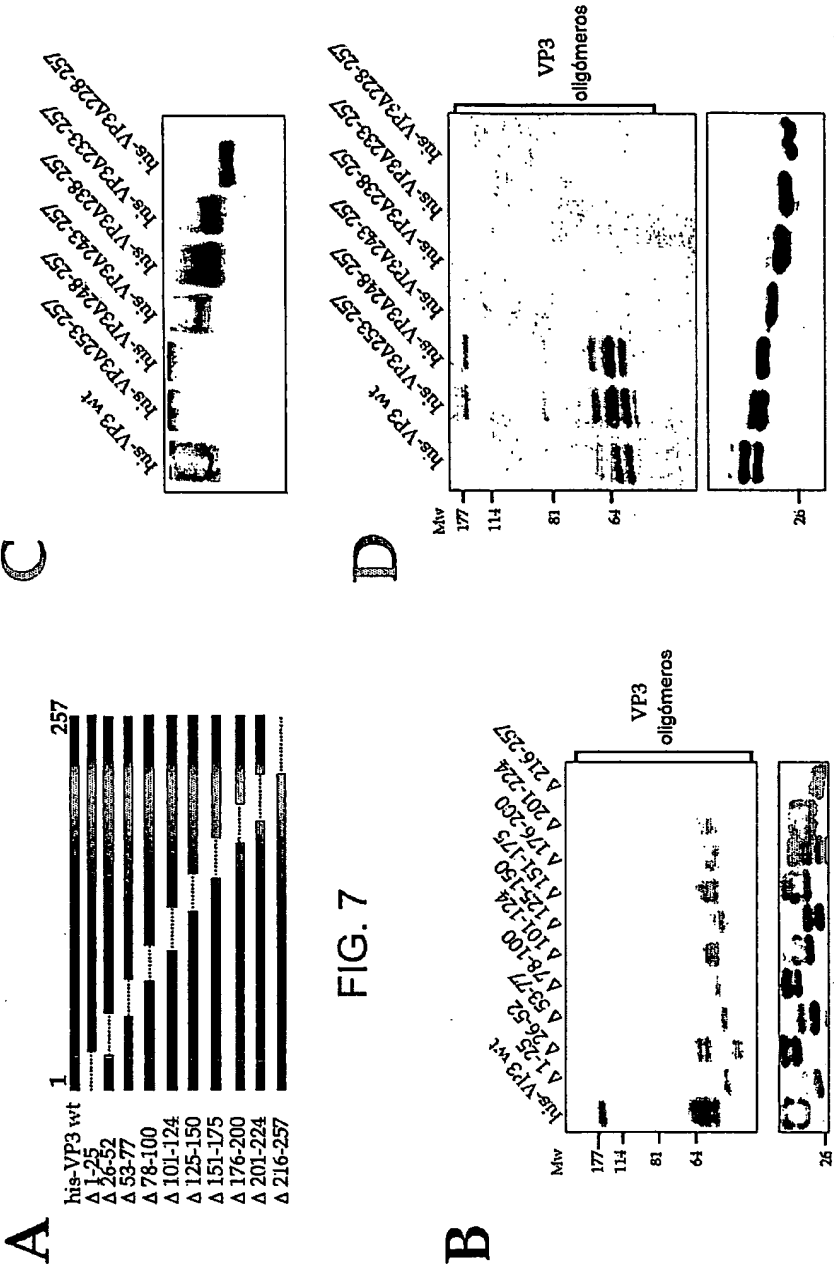


FIG. 5





A

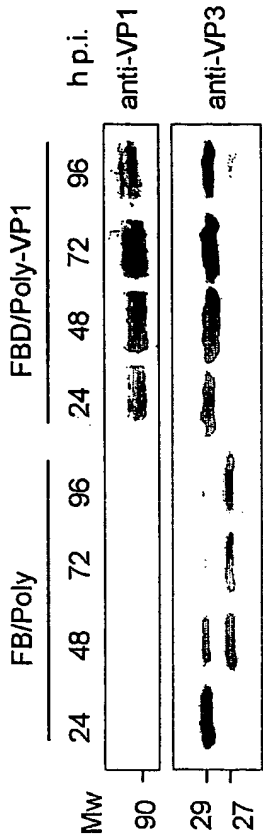
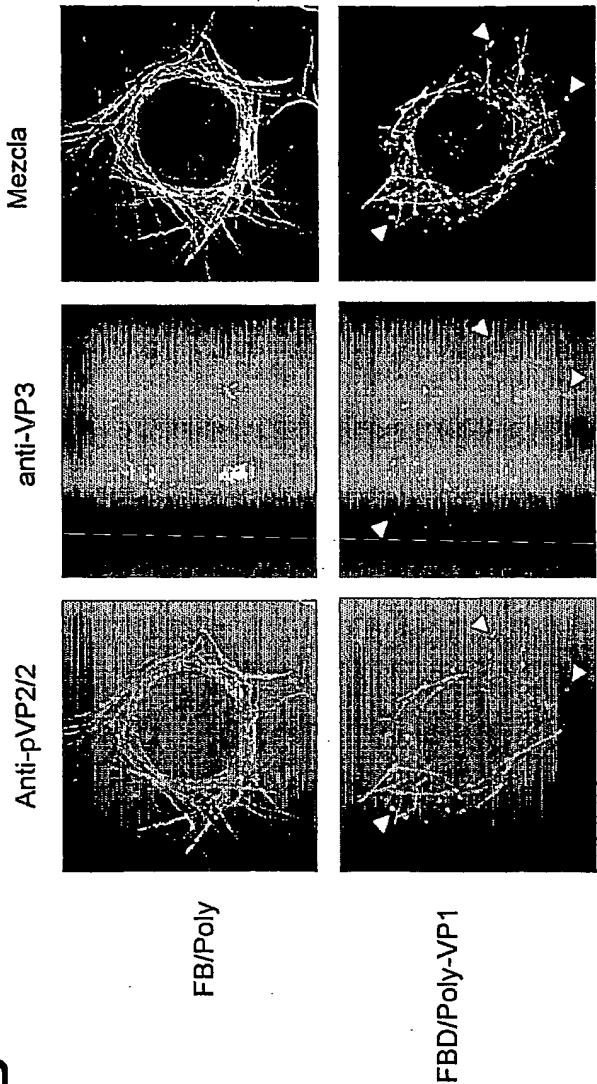
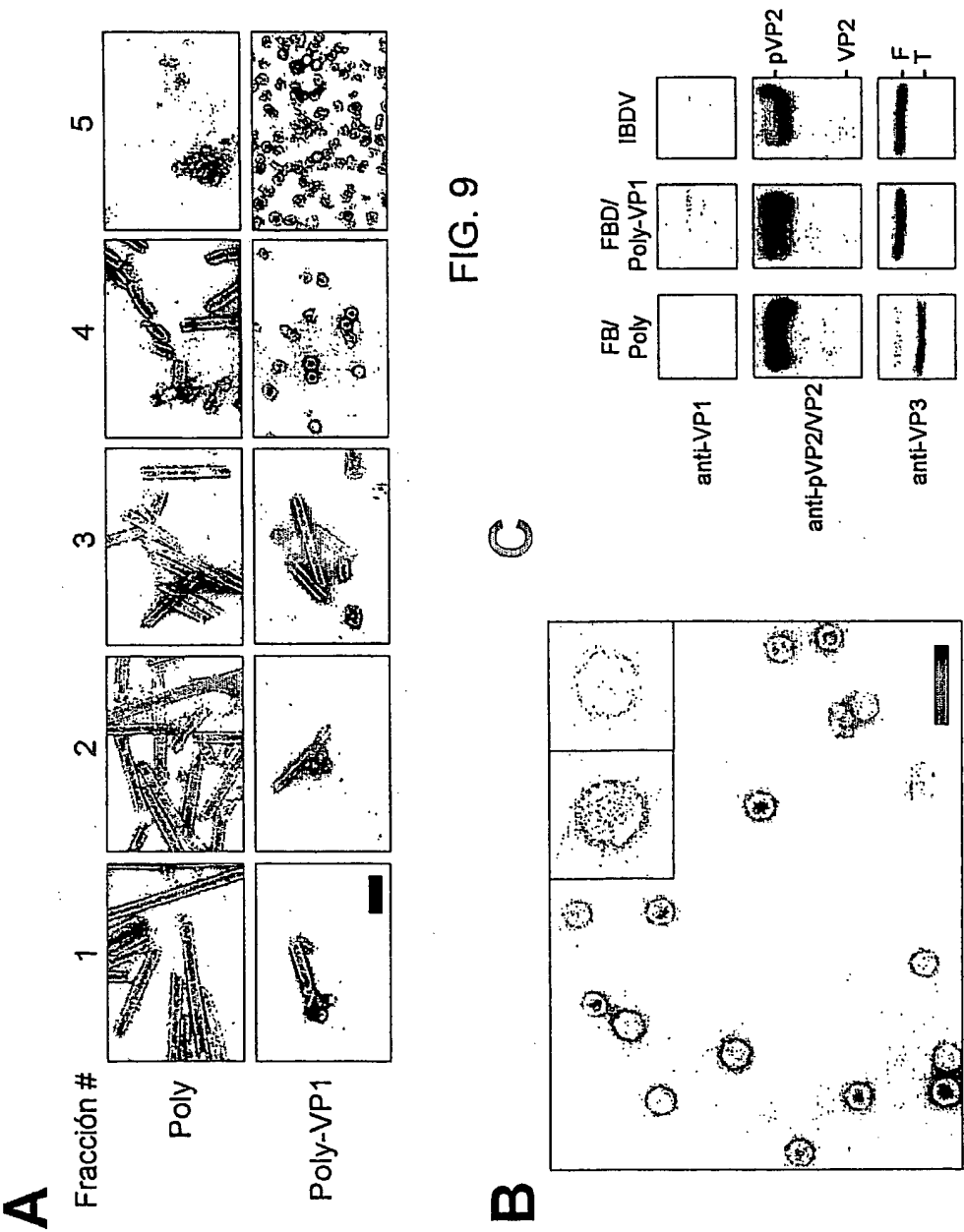


FIG. 8

B





LISTA DE SECUENCIAS

<110> CONSEJO SUPERIOR DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
<110> BIONOSTRA, S.L.

<120> PARTÍCULAS VIRALES VACÍAS COMPLETAS DEL VIRUS INDUCTOR DE LA
BURSITIS INFECCIOSA (IBDV), PROCEDIMIENTO PARA SU PRODUCCIÓN Y
APLICACIONES

<150> P200300751
<151> 2003-03-31

<160> 9

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1
<211> 10909
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Construcción genética poliproteína-VP1 de IBDV

<220>
<221> gen
<222> (3)..(3041)
<223> Fase de Lectura Abierta de la Poliproteína de IBDV en cadena
complementaria reversa

<220>
<221> promotor
<222> (3083)..(3211)
<223> Promotor de poliedrina de AcMNV

<220>
<221> promotor
<222> (3230)..(3351)
<223> Promotor p10 de AcMNV

<220>
<221> CDS
<222> (3388)..(6027)
<223> Fase de Lectura Abierta de la proteína VP1 de IBDV

<220>
<221> polyA_site
<222> (6068)..(6331)
<223>

<220>
<221> gen
<222> (6901)..(7434)
<223> Gen de resistencia a Gentamicina

<220>
<221> misc_feature
<222> (7501)..(7725)
<223> Minitransposon Tn7R

2

<220>
 <221> gen
 <222> (8787)..(9647)
 <223> Gen de resistencia a Ampicilina

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (9854)..(10234)
 <223> F1

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (10418)..(10583)
 <223> Minitransposon Tn7L

<400> 1
 gctcactcaa ggtcctcatc agagacggtc ctgatccagc ggcccagccg accagggggt 60
 ctctgtgttg gagcattggg ttttggttg ggctttggtg gagccgcct gggattgcga 120
 tgcttcatct ccatacgagt caagagcaga tctttcatct gttcttggtt tgggccacgt 180
 ccatggttga tttcatagac tttggcaact tcgtctatga aagcttgggg tggctctgcc 240
 tgtctggag ccccgtagat cgacgtagct gcccttagga tttgttcttc tgatgccaac 300
 cggtcttct ctgcatgcac gtagtctaga tagtcctcgt ttgggtccgg tatttctcgt 360
 ttgttctgcc agtactttac ctggcctggg cttggccctc ggtgcccatt gagtgtacc 420
 cattctggtg ttgcaaagta gatgccatg gtctccatct tctttgagat ccgtgtgtct 480
 ttttccctct gtgcttcctc tgggtgtggg ccccgagcct ccactccgta gcctgctgtc 540
 ccgtacttgg ccctttgcga cttgtgcct gcttgtggtg cgtttgcaag aaaatttcgc 600
 atccgatggg cgttcgggtc gctgagtgcg aagttggcca tgtcagtcac aatcccatc 660
 tcttcagcc acatgaacac actgagtgcg gattggaata gtgggtccac gttggctgct 720
 gcttccattg ctctgacggc actctcagat tcgggggtct ctttgaactc tgatgcagcc 780
 atggcaaggt ggtactggcg tcctgcattg ggtggaaggt atggtagggt gaggtagggg 840
 agcctgtccc agtcgcgtgg attgtgaggg aaacgtttga tgaacgttgc ccagttgggc 900
 ccggtgttta catcgaatgc tccgggacca gccaacctaa ggccaagtcg gtgtgcagta 960
 gcgagcttgg tgcttctaaa gcttactttc tcaatctcgc cacaagcatt gagggctccc 1020
 gtcatagcc catggattgg gactttgggt cgaaacacat ccatgtaagc tatggctaga 1080
 tttccactgt tcccacaat aggaggtatg ggatctttgg acagcataat gctgtcgtcc 1140
 cagacatcat ctattgggac aacggtgtag tctctcccag tctccagtgg aagtaccca 1200
 tctggagcat atccatagac tctgtgtcca gagagagttc gtatgaagga tcctctttga 1260
 gatggaggtt ggaggtcttc tcgcacgcct tcaatgacag caaacatctt gctgttcaat 1320
 gctttgggtg tcatggcgtc ttccactgtc gtaataacca cagggaatag cgtggcacc 1380

tctcttaaca cgcagtcgag gttgtgtgca ccgcggagta ccccagggtga agcaagaatc 1440
ccgtcgacta cgggattctg gggcacctgg aatagattcg cgactacctc gtaccccttg 1500
tcggcggcga gagtcagctg ccttatgcgg cctgaggcag ctcttgcttt tcctgacgcy 1560
gctcgagcag ttccctgaagc ggccctgggcc tcatcgccca gcaggtagtc tacaccttcc 1620
ccaattgcat gggctagggg agcggcaggt gggacaatg tggagaccac cggcacagct 1680
atcctcctta tggcccgat tatgtctttg aagccgaatg ctcccgcaat cttcaggga 1740
gagttgaggt cggccacctc catgaagtat tcacgaaagt cagtgtactc ccttggtggc 1800
cagacggtct tgatgccaaag acggtccctc tcactcagta tcaattttgt gtagttcatg 1860
gctcctgggt caaatcgcc gtattctgta accaggttct ttgctagtcc aggatttggg 1920
atcagctcga agttgctcac ccagcgacc gtaacgacgg atcctgttgc cactctttcg 1980
taggccacta gcgtgacggg acggagggcc cctggatagt tgccaccatg gatcgctact 2040
gctaggctcc ctcttgccga ccatgacatc tgatccctg cctgaccacc acttttggag 2100
gtcactatct ccagtttgat ggatgtgatt ggctgggtta tctcgtttgt tggaatcaca 2160
agattgaatg gcataagggt gtcggtgccg gtcgtcagcc cattgtttgc ggccacagcc 2220
ctggtgatta ccgttgtccc atcaaagcct atgaggtaga tggcggcc cagtacaagg 2280
ccgtggacgc ttgttcgaaa cacgagctct cccccaacgc tgaggcttgt gatggcatca 2340
atgttggtg agaacagtgt gattgttacc ccacctggtt ggtactgtga tgagaattgg 2400
taatcatcgg ctgcagttat ggtgtagact ctgggcctgt cactgctgtc acatgtggct 2460
accatttttg ggtcaagccc tattgcggga atggggtcac caagcctcac ataccaaga 2520
tcatatgatg tgggtaagct gaggacggtg accccttccc ctactaggac gttcccaatt 2580
ttgtcgttga tggtggctgt tgcagacatc aaccattgt agctaacatc tgtcagttca 2640
ctcaggcttc cttggaaggt cacggcggtt atggtgccgt ttagtgcata aacgccacca 2700
ggaagtgtgc ttgacctcac tgtgagactc cgactcacta gcctgcagta gttgtaactg 2760
gccggtaggt tctgggcagt caggagcatc tgatcgaaact ttagttccc attgccctgc 2820
agtgtgtagt gagcaccac aattgagcca gggaaatccag ggaaaaagac aattagccct 2880
gacctgtgt ccccccagc caaattgtag gtcgaggtct ctgacctgag agtgtgcttc 2940
tccagggtgt cgtccggaat ggacgccgt ccggttggtg gcatcagaag gctccgtatg 3000
aacggaacaa tctgctgggt ttgatctgac aggtttgtca tcgatgcgat cgaattccgc 3060
gcgcttcgga ccgggatccg cggccgatgg tgggacggt tgaataatcc ggaatattta 3120
taggtttttt tattacaaaa ctgttacgaa aacagtaaaa tacttattta tttgcgagat 3180

4

ggttatcatt ttaattatct ccatgatcta ttaatatcc ggagtatacg gacctttaat	3240
tcaacccaac acaatatatt atagttaaata aagaattatt atcaaatacat ttgtatatta	3300
attaaaatac tatactgtaa attacatttt atttacaatc actcgacgaa gacttgatca	3360
cccgggatct cgaggtcgac ggtatcg atg agt gac gtt ttc aat agt cca cag	3414
Met Ser Asp Val Phe Asn Ser Pro Gln	
1 5	
gcg cga agc acg atc tca gca gcg ttc ggc ata aag cct act gct gga	3462
Ala Arg Ser Thr Ile Ser Ala Ala Phe Gly Ile Lys Pro Thr Ala Gly	
10 15 20 25	
caa gac gtg gaa gaa ctc ttg atc cct aaa gtt tgg gtg cca cct gag	3510
Gln Asp Val Glu Glu Leu Leu Ile Pro Lys Val Trp Val Pro Pro Glu	
30 35 40	
gat ccg ctt gcc agc cct agt cga ctg gca aag ttc ctc aga gag aac	3558
Asp Pro Leu Ala Ser Pro Ser Arg Leu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Asn	
45 50 55	
ggc tac aaa gtt ttg cag ccg cgg tct ctg ccc gag aat gag gag tat	3606
Gly Tyr Lys Val Leu Gln Pro Arg Ser Leu Pro Glu Asn Glu Glu Tyr	
60 65 70	
gag acc gac caa ata ctc cca gac tta gca tgg atg cga cag ata gaa	3654
Glu Thr Asp Gln Ile Leu Pro Asp Leu Ala Trp Met Arg Gln Ile Glu	
75 80 85	
ggg gct gtt tta aaa ccc act cta tct ctc cct att gga gat cag gag	3702
Gly Ala Val Leu Lys Pro Thr Leu Ser Leu Pro Ile Gly Asp Gln Glu	
90 95 100 105	
tac ttc cca aag tac tac cca aca cat cgc cct agc aag gag aag ccc	3750
Tyr Phe Pro Lys Tyr Tyr Pro Thr His Arg Pro Ser Lys Glu Lys Pro	
110 115 120	
aat gcg tac cca cca gac atc gca cta ctc aag cag atg att tac ctg	3798
Asn Ala Tyr Pro Pro Asp Ile Ala Leu Leu Lys Gln Met Ile Tyr Leu	
125 130 135	
ttt ctc cag gtt cca gag gcc aac gag ggc cta aag gat gaa gta acc	3846
Phe Leu Gln Val Pro Glu Ala Asn Glu Gly Leu Lys Asp Glu Val Thr	
140 145 150	
ctc ttg acc caa aac ata agg gac aag gcc tat gga agt ggg acc tac	3894
Leu Leu Thr Gln Asn Ile Arg Asp Lys Ala Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr	
155 160 165	
atg gga caa gca aat cga ctt gtg gcc atg aag gag gtc gcc act gga	3942
Met Gly Gln Ala Asn Arg Leu Val Ala Met Lys Glu Val Ala Thr Gly	
170 175 180 185	
aga aac cca aac aag gat cct cta aag ctt ggg tac act ttt gag agc	3990
Arg Asn Pro Asn Lys Asp Pro Leu Lys Leu Gly Tyr Thr Phe Glu Ser	
190 195 200	
atc gcg cag cta ctt gac atc aca cta ccg gta ggc cca ccc ggt gag	4038
Ile Ala Gln Leu Leu Asp Ile Thr Leu Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu	
205 210 215	

5

gat gac aag ccc tgg gtg cca ctc aca aga gtg ccg tca cgg atg ttg Asp Asp Lys Pro Trp Val Pro Leu Thr Arg Val Pro Ser Arg Met Leu 220 225 230	4086
gtg ctg acg gga gac gta gat ggc gac ttt gag gtt gaa gat tac ctt Val Leu Thr Gly Asp Val Asp Gly Asp Phe Glu Val Glu Asp Tyr Leu 235 240 245	4134
ccc aaa atc aac ctc aag tca tca agt gga cta cca tat gta ggt cgc Pro Lys Ile Asn Leu Lys Ser Ser Ser Gly Leu Pro Tyr Val Gly Arg 250 255 260 265	4182
acc aaa gga gag aca att ggc gag atg ata gct ata tca aac cag ttt Thr Lys Gly Glu Thr Ile Gly Glu Met Ile Ala Ile Ser Asn Gln Phe 270 275 280	4230
ctc aga gag cta tca aca ctg ttg aag caa ggt gca ggg aca aag ggg Leu Arg Glu Leu Ser Thr Leu Leu Lys Gln Gly Ala Gly Thr Lys Gly 285 290 295	4278
tca aac aag aag aag cta ctc agc atg tta agt gac tat tgg tac tta Ser Asn Lys Lys Lys Leu Leu Ser Met Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr Leu 300 305 310	4326
tca tgc ggg ctt ttg ttt cca aag gct gaa agg tac gac aaa agt aca Ser Cys Gly Leu Leu Phe Pro Lys Ala Glu Arg Tyr Asp Lys Ser Thr 315 320 325	4374
tgg ctc acc aag acc cgg aac ata tgg tca gct cca tcc cca aca cac Trp Leu Thr Lys Thr Arg Asn Ile Trp Ser Ala Pro Ser Pro Thr His 330 335 340 345	4422
ctc atg atc tcc atg atc acc tgg ccc gtg atg tcc aac agc cca aat Leu Met Ile Ser Met Ile Thr Trp Pro Val Met Ser Asn Ser Pro Asn 350 355 360	4470
aac gtg ttg aac att gaa ggg tgt cca tca ctc tac aaa ttc aac ccg Asn Val Leu Asn Ile Glu Gly Cys Pro Ser Leu Tyr Lys Phe Asn Pro 365 370 375	4518
ttc aga gga ggg ttg aac agg atc gtc gag tgg ata ttg gcc ccg gaa Phe Arg Gly Gly Leu Asn Arg Ile Val Glu Trp Ile Leu Ala Pro Glu 380 385 390	4566
gaa ccc aag gct ctt gta tat gcg gac aac ata tac att gtc cac tca Glu Pro Lys Ala Leu Val Tyr Ala Asp Asn Ile Tyr Ile Val His Ser 395 400 405	4614
aac acg tgg tac tca att gac cta gag aag ggt gag gca aac tgc act Asn Thr Trp Tyr Ser Ile Asp Leu Glu Lys Gly Glu Ala Asn Cys Thr 410 415 420 425	4662
cgc caa cac atg caa gcc gca atg tac tac ata ctc acc aga ggg tgg Arg Gln His Met Gln Ala Ala Met Tyr Tyr Ile Leu Thr Arg Gly Trp 430 435 440	4710
tca gac aac ggc gac cca atg ttc aat caa aca tgg gcc acc ttt gcc Ser Asp Asn Gly Asp Pro Met Phe Asn Gln Thr Trp Ala Thr Phe Ala 445 450 455	4758

6

atg aac att gcc cct gct cta gtg gtg gac tca tcg tgc ctg ata atg	4806
Met Asn Ile Ala Pro Ala Leu Val Val Asp Ser Ser Cys Leu Ile Met	
460 465 470	
aac ctg caa att aag acc tat ggt caa ggc agc ggg aat gca gcc acg	4854
Asn Leu Gln Ile Lys Thr Tyr Gly Gln Gly Ser Gly Asn Ala Ala Thr	
475 480 485	
ttc atc aac aac cac ctc ttg agc acg cta gtg ctt gac cag tgg aac	4902
Phe Ile Asn Asn His Leu Leu Ser Thr Leu Val Leu Asp Gln Trp Asn	
490 495 500 505	
ttg atg aga cag ccc aga cca gac agc gag gag ttc aaa tca att gag	4950
Leu Met Arg Gln Pro Arg Pro Asp Ser Glu Glu Phe Lys Ser Ile Glu	
510 515 520	
gac aag cta ggt atc aac ttt aag att gag agg tcc att gat gat atc	4998
Asp Lys Leu Gly Ile Asn Phe Lys Ile Glu Arg Ser Ile Asp Asp Ile	
525 530 535	
agg ggc aag ctg aga cag ctt gtc ctc ctt gca caa cca ggg tac ctg	5046
Arg Gly Lys Leu Arg Gln Leu Val Leu Leu Ala Gln Pro Gly Tyr Leu	
540 545 550	
agt ggg ggg gtt gaa cca gaa caa tcc agc cca act gtt gag ctt gac	5094
Ser Gly Gly Val Glu Pro Glu Gln Ser Ser Pro Thr Val Glu Leu Asp	
555 560 565	
cta cta ggg tgg tca gct aca tac agc aaa gat ctc ggg atc tat gtg	5142
Leu Leu Gly Trp Ser Ala Thr Tyr Ser Lys Asp Leu Gly Ile Tyr Val	
570 575 580 585	
ccg gtg ctt gac aag gaa cgc cta ttt tgt tct gct gcg tat ccc aag	5190
Pro Val Leu Asp Lys Glu Arg Leu Phe Cys Ser Ala Ala Tyr Pro Lys	
590 595 600	
gga gta gag aac aag agt ctc aag tcc aaa gtc ggg atc gag cag gca	5238
Gly Val Glu Asn Lys Ser Leu Lys Ser Lys Val Gly Ile Glu Gln Ala	
605 610 615	
tac aag gta gtc agg tat gag gcg tta agg ttg gta ggt ggt tgg aac	5286
Tyr Lys Val Val Arg Tyr Glu Ala Leu Arg Leu Val Gly Gly Trp Asn	
620 625 630	
tac cca ctc ctg aac aaa gcc tgc aag aat aac gca ggc gcc gct cgg	5334
Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Ala Cys Lys Asn Asn Ala Gly Ala Ala Arg	
635 640 645	
cgg cat ctg gag gcc aag ggg ttc cca ctc gac gag ttc cta gcc gag	5382
Arg His Leu Glu Ala Lys Gly Phe Pro Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu	
650 655 660 665	
tgg tct gag ctg tca gag ttc ggt gag gcc ttc gaa ggc ttc aat atc	5430
Trp Ser Glu Leu Ser Glu Phe Gly Glu Ala Phe Glu Gly Phe Asn Ile	
670 675 680	
aag ctg acc gta aca tct gag agc cta gcc gaa ctg aac aag cca gta	5478
Lys Leu Thr Val Thr Ser Glu Ser Leu Ala Glu Leu Asn Lys Pro Val	
685 690 695	

7

ccc ccc aag ccc cca aat gtc aac aga cca gtc aac act ggg gga ctc Pro Pro Lys Pro Pro Asn Val Asn Arg Pro Val Asn Thr Gly Gly Leu 700 705 710	5526
aag gca gtc agc aac gcc ctc aag acc ggt cgg tac agg aac gaa gcc Lys Ala Val Ser Asn Ala Leu Lys Thr Gly Arg Tyr Arg Asn Glu Ala 715 720 725	5574
gga ctg agt ggt ctc gtc ctt cta gcc aca gca aga agc cgt ctg caa Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu Leu Ala Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gln 730 735 740 745	5622
gat gca gtt aag gcc aag gca gaa gcc gag aaa ctc cac aag tcc aag Asp Ala Val Lys Lys Ala Glu Ala Glu Lys Leu His Lys Ser Lys 750 755 760	5670
cca gac gac ccc gat gca gac tgg ttc gaa aga tca gaa act ctg tca Pro Asp Asp Pro Asp Ala Asp Trp Phe Glu Arg Ser Glu Thr Leu Ser 765 770 775	5718
gac ctt ctg gag aaa gcc gac atc gcc agc aag gtc gcc cac tca gca Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asp Ile Ala Ser Lys Val Ala His Ser Ala 780 785 790	5766
ctc gtg gaa aca agc gac gcc ctt gaa gca gtt cag tcg act tcc gtg Leu Val Glu Thr Ser Asp Ala Leu Glu Ala Val Gln Ser Thr Ser Val 795 800 805	5814
tac acc ccc aag tac cca gaa gtc aag aac cca cag acc gcc tcc aac Tyr Thr Pro Lys Tyr Pro Glu Val Lys Asn Pro Gln Thr Ala Ser Asn 810 815 820 825	5862
ccg gtt gtt ggg ctc cac ctg ccc gcc aag agg gcc acc ggt gtc cag Pro Val Val Gly Leu His Leu Pro Ala Lys Arg Ala Thr Gly Val Gln 830 835 840	5910
gcc gct ctt ctc gga gca gga acg agc aga cca atg ggg atg gag gcc Ala Ala Leu Leu Gly Ala Gly Thr Ser Arg Pro Met Gly Met Glu Ala 845 850 855	5958
cca aca cgg tcc aag aac gcc gtg aaa atg gcc aaa cgg cgg caa cgc Pro Thr Arg Ser Lys Asn Ala Val Lys Met Ala Lys Arg Arg Gln Arg 860 865 870	6006
caa aag gag agc cgc caa tag ccatgaggcg gccctgatgc atagcatgcg Gln Lys Glu Ser Arg Gln 875	6057
gtaccgggag atgggggagg ctaactgaaa cacggaagga gacaataccg gaaggaaccc	6117
gcgctatgac ggcaataaaa agacagaata aaacgcacgg gtgttggtc gtttgttcat	6177
aaacgcgggg ttcggtccca gggctggcac tctgtcgata cccaccgag accccattgg	6237
gaccaatacg cccgcgttcc ttccttttcc ccaccccaac cccaagtcc gggatgaaggc	6297
ccagggctcg cagccaacgt cggggcgcca agccctgcca tagccactac gggatgtag	6357
gcccaaccact agaactatag ctagagtcct gggcgaaaca acgatgctcg ccttcagaa	6417

aaccgaggat gcgaaccact tcatccgggg tcagcaccac cggcaagcgc cgcgacggcc 6477
gaggtctacc gatctcctga agccagggca gatccgtgca cagcaccttg ccgtagaaga 6537
acagcaaggc cgccaatgcc tgacgatgcg tggagaccga aaccttgcg cgttcgcca 6597
gccaggacag aaatgcctcg acttcgctgc tgcccaaggt tgccgggtga cgcacaccgt 6657
ggaaacggat gaaggcacga acccagttga cataagcctg ttcggttcgt aaactgtaat 6717
gcaagtagcg tatgcgctca cgcaactggt ccagaacctt gaccgaacgc agcggtggtta 6777
acggcgagct ggcggttttc atggcttggt atgactgttt tttgtacag tctatgcctc 6837
gggcatccaa gcagcaagcg cgttacgccg tgggtcgatg tttgatgtta tggagcagca 6897
acgatgttac gcagcagcaa cgatgttacg cagcagggca gtccgctaa aacaaagtta 6957
ggtggctcaa gtatgggcat cattcgcaca tgtaggctcg gccctgacca agtcaaattc 7017
atgcgggctg ctcttgatct tttcggtcgt gagttcggag acgtagccac ctactccaa 7077
catcagccgg actccgatta cctcgggaac ttgctccgta gtaagacatt catcgcgctt 7137
gctgccttcg accaagaagc ggttggtggc gctctcgcg cttacgttct gccaggttt 7197
gagcagccgc gtagtgagat ctatatctat gatctcgag tctccggcga gcaccggagg 7257
cagggcattg ccaccgcgt catcaatctc ctcaagcatg aggccaacgc gcttggtgct 7317
tatgtgatct acgtgcaagc agattacggt gacgatcccg cagtggctct ctatacaaag 7377
ttgggcatac gggaagaagt gatgcacttt gatatcgacc caagtaccgc cacctaaca 7437
ttcgttcaag ccgagatcgg cttcccgcc gcggagttgt tcggtaaatt gtcacaacgc 7497
cgcgaatata gtctttacca tgcccttggc cagcccccctc ttttaatacga cgggcaattt 7557
gcacttcaga aaatgaagag tttgctttag ccataacaaa agtccagtat gctttttcac 7617
agcataactg gactgatctc agtttacaac tattctgtct agtttaagac tttattgtca 7677
tagtttagat ctattttggt cagtttaaga ctttattgtc cgcacacacc cgcttacgca 7737
gggcatccat ttattactca accgtaaccg attttgccag gttacgcggc tggctcgcg 7797
tgtgaaatac cgcacagatg cgtaaggaga aaataccgca tcaggcgctc ttccgcttcc 7857
tcgctcactg actcgctcg ctcggtcgtt cggctgcggc gagcggatc agctcactca 7917
aaggcggtaa tacggttatc cacagaatca ggggataacg caggaaagaa catgtgagca 7977
aaaggccagc aaaaggccag gaaccgtaaa aaggccgcgt tgctggcggt tttccatagg 8037
ctccgcccc ctgacgagca tcacaaaaat cgacgtcaa gtcagaggtg gcgaaaccgc 8097
acaggactat aaagatacca ggcgtttccc cctggaagct ccctcgtcg ctctcctgtt 8157
ccgaccctgc cgcttaccgg atacctgtcc gcctttctcc cttcgggaag cgtggcgctt 8217
tctcaatgct cacgctgtag gtatctcagt tcggtgtagg tcgttcgctc caagctgggc 8277

tgtgtgcacg aaccccccg tccagcccgac cgtgcgcct tatccggtaa ctatcgtctt 8337
 gagtccaacc cggtaagaca cgacttatcg ccactggcag cagccactgg taacaggatt 8397
 agcagagcga ggtatgtagg cggtgctaca gagttcttga agtgggtggc taactacggc 8457
 tacactagaa ggacagtatt tggatatctgc gctctgctga agccagttac cttcggaata 8517
 agagttggta gctcttgatc cggcaaacaa accaccgctg gtagcgggtg tttttttgtt 8577
 tgcaagcagc agattacgcg cagaaaaaaaa ggatctcaag aagatccttt gatcttttct 8637
 acgggggtctg acgctcagtg gaacgaaaac tcacgttaag ggatttttgt catgagatta 8697
 tcaaaaagga tcttcaccta gatcctttta aattaaaaat gaagttttaa atcaatctaa 8757
 agtatatatg agtaaacttg gtctgacagt taccaatgct taatcagtga ggcacctatc 8817
 tcagcgatct gtctatttcg ttcattccata gttgcctgac tccccgctgt gtagataact 8877
 acgatacggg agggccttacc atctggcccc agtgctgcaa tgataccgcg agaccacgcg 8937
 tcaccggctc cagattttatc agcaataaac cagccagccg gaaggggcga gcgcagaagt 8997
 ggtcctgcaa ctttatccgc ctccatccag tctattaatt gttgccggga agctagagta 9057
 agtagttcgc cagttaatag tttgcgcaac gttgttgcca ttgctacagg catcgtggtg 9117
 tcacgctcgt cgtttggtat ggcttcattc agtcccggtt cccaacgata aaggcgagtt 9177
 acatgatccc ccatgttgtg caaaaaagcg gttagctcct tcggtcctcc gatcgttgtc 9237
 agaagtaagt tggcgcgagt gttatcactc atgggttatg cagcactgca taattctctt 9297
 actgtcatgc catccgtaag atgcttttct gtgactgggt agtactcaac caagtcattc 9357
 tgagaatagt gtatgcggcg accgagttgc tcttgcccg cgtcaatacg ggataatacc 9417
 gcgccacata gcgaactttt aaaagtgtc atcattggaa aacgttcttc ggggcgaaaa 9477
 ctctcaagga tcttaccgct gttgagatcc agttcgatgt aaccactcgc tgcacccaac 9537
 tgatcttcag catcttttac tttcaccagc gtttctgggt gagcaaaaac aggaaggcaa 9597
 aatgccgcaa aaaagggaat aaggcgaca cggaaatgtt gaatactcat actcttcctt 9657
 tttcaatatt attgaagcat ttatcagggt tattgtctca tgagcggata catatttgaa 9717
 tgtattttaga aaaataaaca aataggggtt ccgcgcacat tccccgaaa agtgccacct 9777
 gaaattgtaa acgttaatat tttgttaaaa ttcgcgttaa atttttgtta aatcagctca 9837
 ttttttaacc aataggccga aatcggaaca atcccttata aatcaaaaga atagaccgag 9897
 atagggttga gtgttggtcc agtttggaac aagagtccac tattaaagaa cgtggactcc 9957
 aacgtcaaag ggcaaaaaac cgtctatcag ggcgatggcc cactacgtga accatcacc 10017
 taatcaagtt ttttggggtc gaggtgccgt aaagcactaa atcggaaacc taaaggagc 10077
 ccccgattta gagcttgacg gggaaagccg gcgaacgtg cgagaaagga agggaagaaa 10137

10

gcgaaaggag cgggcgctag ggcgctggca agtgtagcgg tcacgctgcg cgtaaccacc 10197
 acaccgccc cgcttaatgc gccgctacag ggcgctccc attcgccatt caggctgcaa 10257
 ataagcgttg atattcagtc aattacaaac attaataacg aagagatgac agaaaaattt 10317
 tcattctgtg acagagaaaa agtagccgaa gatgacgggt tgtcacatgg agttggcagg 10377
 atgtttgatt aaaaacataa caggaagaaa aatgccccgc tgtgggaggga caaaatagtt 10437
 gggaactggg aggggtggaa atggagtttt taaggattat ttagggaaga gtgacaaaat 10497
 agatgggaac tgggtgtagc gtcgtaagct aatacgaaaa ttaaaaatga caaaatagtt 10557
 tggaactaga ttccacttat ctgggttcgga tctcctaggc tcaagcagtg atcagatcca 10617
 gacatgataa gatacattga tgagtttgga caaaccacaa ctagaatgca gtgaaaaaaaa 10677
 tgctttatgt gtgaaatttg tgatgctatt gctttatttg taaccattat aagctgcaat 10737
 aaacaagtta acaacaacaa ttgcattcat tttatgtttc aggttcaggg ggaggtgtgg 10797
 gaggtttttt aaagcaagta aaacctctac aaatgtggta tggctgatta tgatcctcta 10857
 gtacttctcg acaagcttgt cgagactgca ggctctagat tcgaaagcgg cc 10909

<210> 2
 <211> 879
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Proteína VP1 de IBV

<400> 2
 Met Ser Asp Val Phe Asn Ser Pro Gln Ala Arg Ser Thr Ile Ser Ala
 1 5 10 15
 Ala Phe Gly Ile Lys Pro Thr Ala Gly Gln Asp Val Glu Glu Leu Leu
 20 25 30
 Ile Pro Lys Val Trp Val Pro Pro Glu Asp Pro Leu Ala Ser Pro Ser
 35 40 45
 Arg Leu Ala Lys Phe Leu Arg Glu Asn Gly Tyr Lys Val Leu Gln Pro
 50 55 60
 Arg Ser Leu Pro Glu Asn Glu Glu Tyr Glu Thr Asp Gln Ile Leu Pro
 65 70 75 80
 Asp Leu Ala Trp Met Arg Gln Ile Glu Gly Ala Val Leu Lys Pro Thr
 85 90 95
 Leu Ser Leu Pro Ile Gly Asp Gln Glu Tyr Phe Pro Lys Tyr Tyr Pro
 100 105 110
 Thr His Arg Pro Ser Lys Glu Lys Pro Asn Ala Tyr Pro Pro Asp Ile
 115 120 125

11

Ala Leu Leu Lys Gln Met Ile Tyr Leu Phe Leu Gln Val Pro Glu Ala
 130 135 140

Asn Glu Gly Leu Lys Asp Glu Val Thr Leu Leu Thr Gln Asn Ile Arg
 145 150 155 160

Asp Lys Ala Tyr Gly Ser Gly Thr Tyr Met Gly Gln Ala Asn Arg Leu
 165 170 175

Val Ala Met Lys Glu Val Ala Thr Gly Arg Asn Pro Asn Lys Asp Pro
 180 185 190

Leu Lys Leu Gly Tyr Thr Phe Glu Ser Ile Ala Gln Leu Leu Asp Ile
 195 200 205

Thr Leu Pro Val Gly Pro Pro Gly Glu Asp Asp Lys Pro Trp Val Pro
 210 215 220

Leu Thr Arg Val Pro Ser Arg Met Leu Val Leu Thr Gly Asp Val Asp
 225 230 235 240

Gly Asp Phe Glu Val Glu Asp Tyr Leu Pro Lys Ile Asn Leu Lys Ser
 245 250 255

Ser Ser Gly Leu Pro Tyr Val Gly Arg Thr Lys Gly Glu Thr Ile Gly
 260 265 270

Glu Met Ile Ala Ile Ser Asn Gln Phe Leu Arg Glu Leu Ser Thr Leu
 275 280 285

Leu Lys Gln Gly Ala Gly Thr Lys Gly Ser Asn Lys Lys Lys Leu Leu
 290 295 300

Ser Met Leu Ser Asp Tyr Trp Tyr Leu Ser Cys Gly Leu Leu Phe Pro
 305 310 315 320

Lys Ala Glu Arg Tyr Asp Lys Ser Thr Trp Leu Thr Lys Thr Arg Asn
 325 330 335

Ile Trp Ser Ala Pro Ser Pro Thr His Leu Met Ile Ser Met Ile Thr
 340 345 350

Trp Pro Val Met Ser Asn Ser Pro Asn Asn Val Leu Asn Ile Glu Gly
 355 360 365

Cys Pro Ser Leu Tyr Lys Phe Asn Pro Phe Arg Gly Gly Leu Asn Arg
 370 375 380

Ile Val Glu Trp Ile Leu Ala Pro Glu Glu Pro Lys Ala Leu Val Tyr
 385 390 395 400

Ala Asp Asn Ile Tyr Ile Val His Ser Asn Thr Trp Tyr Ser Ile Asp
 405 410 415

Leu Glu Lys Gly Glu Ala Asn Cys Thr Arg Gln His Met Gln Ala Ala
 420 425 430

Met Tyr Tyr Ile Leu Thr Arg Gly Trp Ser Asp Asn Gly Asp Pro Met
 435 440 445

12

Phe Asn Gln Thr Trp Ala Thr Phe Ala Met Asn Ile Ala Pro Ala Leu
 450 455 460
 Val Val Asp Ser Ser Cys Leu Ile Met Asn Leu Gln Ile Lys Thr Tyr
 465 470 475 480
 Gly Gln Gly Ser Gly Asn Ala Ala Thr Phe Ile Asn Asn His Leu Leu
 485 490 495
 Ser Thr Leu Val Leu Asp Gln Trp Asn Leu Met Arg Gln Pro Arg Pro
 500 505 510
 Asp Ser Glu Glu Phe Lys Ser Ile Glu Asp Lys Leu Gly Ile Asn Phe
 515 520 525
 Lys Ile Glu Arg Ser Ile Asp Asp Ile Arg Gly Lys Leu Arg Gln Leu
 530 535 540
 Val Leu Leu Ala Gln Pro Gly Tyr Leu Ser Gly Gly Val Glu Pro Glu
 545 550 555 560
 Gln Ser Ser Pro Thr Val Glu Leu Asp Leu Leu Gly Trp Ser Ala Thr
 565 570 575
 Tyr Ser Lys Asp Leu Gly Ile Tyr Val Pro Val Leu Asp Lys Glu Arg
 580 585 590
 Leu Phe Cys Ser Ala Ala Tyr Pro Lys Gly Val Glu Asn Lys Ser Leu
 595 600 605
 Lys Ser Lys Val Gly Ile Glu Gln Ala Tyr Lys Val Val Arg Tyr Glu
 610 615 620
 Ala Leu Arg Leu Val Gly Gly Trp Asn Tyr Pro Leu Leu Asn Lys Ala
 625 630 635 640
 Cys Lys Asn Asn Ala Gly Ala Ala Arg Arg His Leu Glu Ala Lys Gly
 645 650 655
 Phe Pro Leu Asp Glu Phe Leu Ala Glu Trp Ser Glu Leu Ser Glu Phe
 660 665 670
 Gly Glu Ala Phe Glu Gly Phe Asn Ile Lys Leu Thr Val Thr Ser Glu
 675 680 685
 Ser Leu Ala Glu Leu Asn Lys Pro Val Pro Pro Lys Pro Pro Asn Val
 690 695 700
 Asn Arg Pro Val Asn Thr Gly Gly Leu Lys Ala Val Ser Asn Ala Leu
 705 710 715 720
 Lys Thr Gly Arg Tyr Arg Asn Glu Ala Gly Leu Ser Gly Leu Val Leu
 725 730 735
 Leu Ala Thr Ala Arg Ser Arg Leu Gln Asp Ala Val Lys Ala Lys Ala
 740 745 750
 Glu Ala Glu Lys Leu His Lys Ser Lys Pro Asp Asp Pro Asp Ala Asp
 755 760 765

13

Trp Phe Glu Arg Ser Glu Thr Leu Ser Asp Leu Leu Glu Lys Ala Asp
770 775 780

Ile Ala Ser Lys Val Ala His Ser Ala Leu Val Glu Thr Ser Asp Ala
785 790 795 800

Leu Glu Ala Val Gln Ser Thr Ser Val Tyr Thr Pro Lys Tyr Pro Glu
805 810 815

Val Lys Asn Pro Gln Thr Ala Ser Asn Pro Val Val Gly Leu His Leu
820 825 830

Pro Ala Lys Arg Ala Thr Gly Val Gln Ala Ala Leu Leu Gly Ala Gly
835 840 845

Thr Ser Arg Pro Met Gly Met Glu Ala Pro Thr Arg Ser Lys Asn Ala
850 855 860

Val Lys Met Ala Lys Arg Arg Gln Arg Gln Lys Glu Ser Arg Gln
865 870 875

<210> 3

<211> 13

<212> PRT

<213> Virus inductor de la bursitis infecciosa (IBDV)

<400> 3

Gly Arg Trp Ile Arg Thr Val Ser Asp Glu Asp Leu Glu
1 5 10

<210> 4

<211> 37

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 5' utilizado para la generación de los distintos mutantes de delección del extremo carboxi terminal de His-VP3 en combinación con las SEQ. ID. NO: 5, SEQ. ID. NO: 6, SEQ. ID. NO: 7, SEQ. ID. NO: 8 y SEQ. ID. NO: 9, respectivamente

<400> 4

gggggaattc atggcatcag agttcaaaga gaccccc

37

<210> 5

<211> 31

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ248-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 5

cgcggtacc ttaccagcgg cccagccgac c

31

14

<210> 6
<211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ243-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 6
cgcggtacc ttaaccagg ggtctctgtg ttg 33

<210> 7
<211> 33
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ238-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 7
cgcggtacc ttatgttgga gcattgggtt ttg 33

<210> 8
<211> 31
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ233-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 8
cgcggtacc ttattttggc ttgggctttg g 31

<210> 9
<211> 31
<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<223> Oligonucleótido iniciador 3' utilizado para la generación del mutante His-VP3Δ228-257 en combinación con la SEQ. ID. NO: 4

<400> 9
cgcggtacc ttatgtaga gccgcctgg g 31

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000147

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 7 C12N7/04, 15/866, A61K39/12

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 7 C12N, A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	LOMBARDO, E., MARAVER, A., CASTÓN, J. R. et al. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. Journal of Virology. August 1999, Vol 73, Nº 8, pages 6973-6983.	1, 2, 8, 13-15, 17, 19-22, 26, 27
Y		3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38
Y	FR 2824327 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA-FR.) 08.11.2002. pages 1-3; page 7, line 19 - page 13.	3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

22 JUL 2004 (22.07.04)

Date of mailing of the international search report

02 AUG 2004 (02.08.04)

Name and mailing address of the ISA/

S.P.T.O.

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/ ES 2004/000147

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	TACKEN, M. G. J., ROTTIER, P. J. M., GIELKENS, A. L. J., PEETERS, B. P. H. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. Journal of General Virology. 2000, Vol 81, pages 209-218.	1-10, 18, 19, 35
A	MARAVER, A., CLEMENTE, R., RODRÍGUEZ, J. F., LOMBARDO, E. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. Journal of Virology. Feb. 2003, Vol 77, Nº4, pages 2459-2468.	1-10, 18, 19, 35
A	KATAGIRI, Y., INGHAM, K. C. Enhanced production of green fluorescence fusion proteins in baculovirus expression system by addition of secretion signal. Biotechniques. July 2002, Vol 33, pages 24-26.	7, 24, 25, 35-38

Information on patent family members

PCT/ ES 2004/000147

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (July 1992)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/ ES 2004/000147

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:

a) Tipo de material

☒ una lista de secuencias

☐ Tabla(s) relativas a la lista de secuencias

b) Formato del material

☐ por escrito

☒ en soporte legible por ordenador

c) Fecha de presentación/entrega

☐ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó

☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador

☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda

2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.

3. Comentarios adicionales:

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°
PCT/ ES 2004/000147

A. CLASIFICACIÓN DEL OBJETO DE LA SOLICITUD

CIP⁷ C12N7/04, 15/866, A61K39/12

De acuerdo con la Clasificación Internacional de Patentes (CIP) o según la clasificación nacional y la CIP.

B. SECTORES COMPRENDIDOS POR LA BÚSQUEDA

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de los símbolos de clasificación)
CIP⁷ C12N, A61K

Otra documentación consultada, además de la documentación mínima, en la medida en que tales documentos formen parte de los sectores comprendidos por la búsqueda

Bases de datos electrónicas consultadas durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, si es posible, términos de búsqueda utilizados)

CIBEPAT, EPODOC, WPI, MEDLINE, BIOSIS, NPL, XPESP

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
X	LOMBARDO, E., MARAVER, A., CASTÓN, J. R. et al. VP1, the putative RNA-dependent RNA polymerase of infectious bursal disease virus, forms complexes with the capsid protein VP3, leading to efficient encapsidation into virus-like particles. Journal of Virology. Agosto 1999, Vol 73, N° 8, páginas 6973-6983.	1, 2, 8, 13-15, 17, 19-22, 26, 27
Y		3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38
Y	FR 2824327 A1 (INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE INRA-FR.) 08.11.2002. Páginas 1-3; página 7, línea 19 - página 13.	3-7, 9-12, 16, 18, 23-25, 28-38

☒ En la continuación del recuadro C se relacionan otros documentos

☒ Los documentos de familias de patentes se indican en el anexo

* Categorías especiales de documentos citados:

"A" documento que define el estado general de la técnica no considerado como particularmente relevante.

"E" solicitud de patente o patente anterior pero publicada en la fecha de presentación internacional o en fecha posterior.

"L" documento que puede plantear dudas sobre una reivindicación de prioridad o que se cita para determinar la fecha de publicación de otra cita o por una razón especial (como la indicada).

"O" documento que se refiere a una divulgación oral, a una utilización, a una exposición o a cualquier otro medio.

"P" documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero con posterioridad a la fecha de prioridad reivindicada.

"T"

documento ulterior publicado con posterioridad a la fecha de presentación internacional o de prioridad que no pertenece al estado de la técnica pertinente pero que se cita por permitir la comprensión del principio o teoría que constituye la base de la invención.

"X"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o que implique una actividad inventiva por referencia al documento aisladamente considerado.

"Y"

documento particularmente relevante; la invención reivindicada no puede considerarse que implique una actividad inventiva cuando el documento se asocia a otro u otros documentos de la misma naturaleza, cuya combinación resulta evidente para un experto en la materia.

"&"

documento que forma parte de la misma familia de patentes.

Fecha en que se ha concluido efectivamente la búsqueda internacional.

22.Julio.2004 (22.07.2004)

Fecha de expedición del informe de búsqueda internacional

02 AGO 2004 02.08.2004

Nombre y dirección postal de la Administración encargada de la búsqueda internacional

O.E.P.M.

Funcionario autorizado

E. Relaño Reyes

C/Panamá 1, 28071 Madrid, España.

N° de fax 34 91 3495304

N° de teléfono + 34 91 3493047

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2004/000147

C (Continuación).

DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría*	Documentos citados, con indicación, si procede, de las partes relevantes	Relevante para las reivindicaciones n°
A	TACKEN, M. G. J., ROTTIER, P. J. M., GIELKENS, A. L. J. PEETERS, B. P. H. Interactions in vivo between the proteins of infectious bursal disease virus: capsid protein VP3 interacts with the RNA-dependent RNA polymerase, VP1. Journal of General Virology. 2000, Vol 81, páginas 209-218.	1-10, 18, 19, 35
A	MARAVER, A., CLEMENTE, R., RODRÍGUEZ, J. F., LOMBARDO, E. Identification and molecular characterization of the RNA polymerase-binding motif of infectious bursal disease virus inner capsid protein VP3. Journal of Virology. Febrero 2003, Vol 77, N°4, páginas 2459-2468.	1-10, 18, 19, 35
A	KATAGIRI, Y., INGHAM, K. C. Enhanced production of green fluorescence fusion proteins in baculovirus expresion system by addition of secretion signal. Biotechniques. Julio 2002, Vol 33, páginas 24-26.	7, 24, 25, 35-38

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
información relativa a miembros de familias de patentes

Solicitud internacional n°

PCT/ ES 2004/000147

Documento de patente citado en el informe de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
FR 2824327 A1, B	08.11.2002	WO 2002088339 A2 AU 2002310654	07.11.2002 11.11.2002

INFORME DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional n°

PCT/ES 2004/000147

Recuadro I Secuencia(s) de nucleótidos y/o de aminoácidos (Continuación del punto 1.b de la primera hoja)

1. En lo que se refiere a las secuencias de nucleótidos y/o de aminoácidos divulgadas en la solicitud internacional y necesarias para la invención reivindicada, la búsqueda se ha llevado a cabo sobre la base de:
 - a) Tipo de material
 - ☒ una lista de secuencias
 - ☐ Tabla(s) relativas a la lista de secuencias
 - b) Formato del material
 - ☐ por escrito
 - ☒ en soporte legible por ordenador
 - c) Fecha de presentación/entrega
 - ☐ contenido en la solicitud internacional tal y como se presentó
 - ☒ presentado junto con la solicitud internacional en formato legible por ordenador
 - ☐ presentado posteriormente a esta Administración a los fines de la búsqueda
2. Además, en caso de que se haya presentado más de una versión o copia de una lista de secuencias y/o tabla relacionada con ella, se ha entregado la declaración requerida de que la información contenida en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a la de la solicitud tal y como se presentó o no va más allá de lo presentado inicialmente.
3. Comentarios adicionales:

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.